

**EVALUACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO EN DIVERSAS
FORMULACIONES DE CHOCOLATERÍA POR DIGESTIÓN
GASTROINTESTINAL *IN VITRO***

CRISTIAN JAHIR MURILLO MÉNDEZ

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Bucaramanga
2019**

**EVALUACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO EN DIVERSAS
FORMULACIONES DE CHOCOLATERÍA POR DIGESTIÓN
GASTROINTESTINAL *IN VITRO***

CRISTIAN JAHIR MURILLO MÉNDEZ

Trabajo de Investigación para optar al título de Magíster en Química

Directores de proyecto:

Daniel Ricardo Molina Velasco (Químico, Doctor en Química)

**Luis Javier López Giraldo (Ing. Químico, Doctor en Química, Bioquímica y
Ciencia de Alimentos)**

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2019

*Dedicado a la persona que creyó en mí,
desde el primer momento que la ví,
tanto de manera profesional como personal y artística,
porque siempre será mi musa,*

Tu poeta.

AGRADECIMEINTOS

Quiero agradecer a mis directores de proyecto, el profesor Daniel Molina y el profesor Luis Javier López, por darme la oportunidad de trabajar con ellos y por depositar su confianza en mi trabajo.

Estoy eternamente agradecido con el grupo de investigación CICTA y su director, el profesor Luis Javier, por darme la oportunidad de ser parte activa del grupo y, durante casi 4 años, de poder crecer de manera profesional en el área de la química de alimentos y ayudar a mi formación integral. Agradezco infinitamente a Arley, Sergio Pico, Luis Carlos, Laura Jaimes, Jeffry, Alejandra y Lady, por brindarme su apoyo en la parte profesional y personal. Agradezco, también, a mis compañeros del CICTA, a Cristian Palencia, Laura Castellanos, David Caballero y los demás profesionales y estudiantes que también han hecho parte de mi formación.

Agradezco infinitamente a mi familia por darme ejemplo de vida, por enseñarme el camino a la perfección, por enseñarme a ser un buen ser humano y un buen profesional. Agradecer que ha sido un apoyo importante y que me han dado las herramientas necesarias para alcanzar esta meta.

Por último, agradezco a los profesores Marianny Combariza y William Hidalgo por su compromiso con la evaluación de mi proyecto de grado, y a todas aquellas personas gratas que aportaron algo a mi formación profesional e integral.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1 MARCO TEÓRICO	17
1.1 GENERALIDADES DEL CACAO	17
1.2 CADMIO COMO CONTAMINANTE	18
1.3 DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	19
1.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	20
2 ESTADO DEL ARTE	21
2.1 CADMIO EN CACAO Y DERIVADOS	21
2.2 DETERMINACIÓN DE CADMIO	25
2.3 BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO	28
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 PARTE EXPERIMENTAL	34
4.1 REACTIVOS Y MUESTRAS	34
4.2 PREPARACIÓN DE COBERTURAS	34
4.2.1 Diseño para la preparación de las formulaciones	34
4.2.2 Cuantificación de Cd total	35
4.3 DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	35
4.3.1 Preparación de soluciones estándar	36

4.3.2	Digestión gástrica <i>in vitro</i>	36
4.3.3	Digestión pancreática <i>in vitro</i>	37
4.3.4	Concentración de Cd bioaccesible	37
4.3.5	Determinación de la bioaccesibilidad del Cd	37
4.4	CORRELACIÓN DE BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO CON COMPONENTES DE FORMULACIONES	38
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1	PRUEBAS PRELIMINARES	39
5.2	EFFECTO DE LOS COMPONENTES	40
5.3	MODELO DE PREDICCIÓN	47
5.4	VALOR MÍNIMO	50
5.5	EVALUACIÓN DEL MODELO	51
5.6	COMPARACIÓN CON OTROS VALORES	52
6	CONCLUSIONES	54
7	RECOMENDACIONES	55
	BIBLIOGRAFÍA	56
	ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Concentración de Cd en muestras de cacao en varias fincas de San Vicente de Chucurí (Martínez y Palacio, 2010).	22
Figura 2. Niveles de Cd en grano y cáscara de cacao de diecinueve regiones de Ecuador (Chávez et al., 2015).	23
Figura 3. Contenido de Cd en el suelo, hojas y grano en varias regiones de Honduras (Gramlich <i>et al.</i> , 2018).	24
Figura 4. Contenido de Cd en granos y hojas de cacao de diferentes genotipos provenientes de Perú (Arévalo-Gardini <i>et al.</i> , 2017).	25
Figura 5. Estructura del complejo de Cd ²⁺ con BDTSC (Reddy <i>et al.</i> , 2008).	26
Figura 6. Estructura del acomplexante bencilbis(carbohidrazona) (Chandra <i>et al.</i> , 2014).	27
Figura 7. Curva de calibración y voltamperograma de patrones de Cd (Chaparro Acuña <i>et al.</i> , 2017).	28
Figura 8. Cromatograma SEC-ICP-MS de un extracto de polvo de cacao (114Cd) con fluido gastrointestinal simulado (Mounicou et al., 2002).	29
Figura 9. Bioaccesibilidad de Al, Cd, Cr, Fe y Zn del polvo de bebida de chocolate según la formulación (Peixoto <i>et al.</i> , 2016).	30
Figura 10. Cambios en el contenido fenólico total durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> del chocolate negro (gris claro), chocolate negro con hojas de té (gris) y chocolate negro con cúrcuma (gris oscuro) (Martini et al., 2018).	32
Figura 11. Valores de pH a través de la digestión gástrica (línea roja) y pancreática (línea azul) donde a) metodología de Minekus sin modificaciones; y b) metodología de Minekus con las modificaciones empleadas.	39

Figura 12. Diagrama de Pareto con los valores absolutos de los efectos estandarizados estimados para el modelo inicial planteado en la ecuación. Las variables A, B, C y D corresponden a cantidad de cacao, leche en polvo, azúcar y concentración de Cd en cacao respectivamente.	42
Figura 13. Gráfica de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de cacao, manteniendo las otras variables fijas a mitad del valor.	43
Figura 14. Gráfica de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de leche, manteniendo las otras variables fijas a mitad del valor.	44
Figura 15. Gráfica de bioaccesibilidad de Cd en función de concentración de Cd en cacao, manteniendo las otras variables fijas a mitad del valor.	46
Figura 16. Gráfica de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de azúcar, manteniendo las otras variables fijas a mitad del valor.	46
Figura 17. Gráfica de valores observados vs valores predichos con el modelo ajustado para el % de bioaccesibilidad de Cd.	48
Figura 18. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de leche y cacao, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Niveles máximos permitidos de Cd en cacao y subproductos estipulados por la Unión Europea.	21
Tabla 2. Descripción de los factores y sus niveles para el diseño de experimentos.	35
Tabla 3. Composición de las soluciones utilizadas como fluidos de las digestiones.	36
Tabla 4. Aparte del Anexo A. Tabla de resultados.	40
Tabla 5. Resultado ANOVA de las variables del modelo inicial planteado.	41
Tabla 6. Puntos experimentales de valor mínimo de % de bioaccesibilidad de Cd utilizando cacao de [Cd] conocida.	50
Tabla 7. Puntos experimentales de formulaciones de chocolate para la validación del modelo ajustado.	51
Tabla 8. Comparación del % de bioaccesibilidad de Cd con otros autores.	52

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Tabla de resultados.	64
Anexo B. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de azúcar y cacao, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.	67
Anexo C. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de [Cd] en cacao y cantidad de leche, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.	67
Anexo D. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de azúcar y leche, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.	68
Anexo E. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de [Cd] en cacao y cantidad de cacao, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor	68
Anexo F. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de [Cd] en cacao y cantidad de azúcar, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.	69

RESUMEN

TITULO: Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en diversas formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal *in vitro*¹

AUTOR: CRISTIAN JAHIR MURILLO MÉNDEZ²

PALABRAS CLAVE: Cacao, Cadmio, Bioaccesibilidad, Digestión gastrointestinal.

DESCRIPCIÓN:

El cacao es uno de los productos agrícolas más importantes del mundo y posee componentes bioactivos de alto impacto biológico como polifenoles, metilxantinas y componentes precursores de aroma. Sin embargo, la mayoría de sus productos derivados, como el chocolate, poseen concentraciones de Cd por encima de las estipuladas por la Unión Europea. Este metal pesado impacta negativamente en la salud humana debido a que su presencia, aún en bajas concentraciones, puede provocar efectos adversos.

Para estudiar la toxicidad del Cd presente en matrices de productos derivados del cacao es necesario conocer la concentración total del mismo en estos productos y determinar el porcentaje de Cd que es bioaccesible en el cuerpo humano. Para tal fin, este trabajo se enfocó en evaluar la bioaccesibilidad de Cd en formulaciones de chocolatería con concentraciones de componentes diferentes por digestión gastrointestinales *in vitro*; se correlacionó las diferencias de bioaccesibilidad con los componentes principales (cacao, leche, azúcar y contenido de Cd total en el cacao); y, por último, se propuso una formulación de chocolate que posea el menor valor de bioaccesibilidad de Cd.

Los resultados se expresaron mediante un modelo matemático, con predicciones de 94% y errores de validación del modelo menores al 12%. Se obtuvieron valores de bioaccesibilidad de Cd en las formulaciones de chocolate entre 7 y 32% aproximadamente, donde los valores más bajos correspondieron a formulaciones de chocolate amargo (proporción de 7 g de cacao y 2 g de azúcar). Se concluyó que el contenido de cacao y de azúcar en la formulación poseen efecto negativo en los valores de bioaccesibilidad de Cd, mientras que el contenido de leche y la concentración de Cd total en el cacao poseen efecto positivo.

¹ Trabajo de grado

² Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Dr. Daniel Molina, Dr. Luis Javier López Giraldo.

ABSTRACT

TITLE: Evaluation of the cadmium bioaccessibility in various chocolate formulations by *in vitro* gastrointestinal digestion¹

AUTHOR: CRISTIAN JAHIR MURILLO MÉNDEZ²

KEYWORDS: Cocoa, Cadmium, Bioaccessibility, gastrointestinal digestion.

DESCRIPCIÓN:

Cocoa is one of the most important agricultural products in the world and has bioactive components with high biological impact such as polyphenols, methylxanthines and aroma precursor components. However, most of its products, such as chocolate, have Cd concentrations above those stipulated by the European Union. This heavy metal negatively impacts human health because its presence, even in low concentrations, can cause adverse effects.

In order to study the toxicity of the Cd present in matrices of cocoa-derived products, it is necessary to know its total concentration in these products and determine the percentage of Cd that is bioaccessible in the human body. To this end, this work focused on evaluating the Cd bioaccessibility in chocolate formulations with concentrations of different components by gastrointestinal digestion *in vitro*; the bioaccessibility differences were correlated with the main components (cocoa, milk, sugar and total Cd content in cocoa); and, finally, a chocolate formulation was proposed that has the lowest Cd bioaccessibility value.

The results were expressed using a mathematical model, with predictions of 94% and model evaluation errors of less than 12%. Cd bioaccessibility values were obtained in chocolate formulations between approximately 7 and 32%, where the lowest values corresponded to *dark chocolate* formulations (proportion of 7 g of cocoa and 2 g of sugar). It was concluded that the cocoa and sugar content in the formulation have a negative effect on the Cd bioaccessibility values, while the milk content and the total Cd concentration in cocoa have a positive effect.

¹ Master Thesis

² Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directors: Dr. Daniel Molina, Dr. Luis Javier López Giraldo.

INTRODUCCIÓN

El cacao es uno de los productos agrícolas más importantes del mundo y posee componentes bioactivos de alto impacto biológico como polifenoles, metilxantinas y componentes precursores de aroma. Sin embargo, la mayoría del cacao colombiano y, por ende, sus productos derivados como el chocolate, poseen concentraciones elevadas de cadmio. Este metal pesado impacta negativamente en la salud humana debido a que su presencia, aún en bajas concentraciones, puede provocar efectos adversos, como problemas cardíacos, hipertensión, daños renales, Alzheimer, entre otros.

Para estudiar la toxicidad del cadmio presente en matrices de productos derivados del cacao es necesario conocer la concentración total del mismo en estos productos y determinar el porcentaje de cadmio que es bioaccesible en el cuerpo humano.

Existen diversos trabajos de investigación en torno a la determinación de concentración total de cadmio en cacao y productos derivados. No obstante, son pocos los trabajos de investigación que estudian la bioaccesibilidad del cadmio. Algunas investigaciones abordan la bioaccesibilidad del cadmio en matrices como bebida de chocolate en polvo o en grano de cacao.

Por lo anterior, este trabajo se enfocó en el estudio y evaluación del efecto de los componentes principales, comúnmente usados en las formulaciones en chocolate (concentración inicial de cadmio, licor de cacao, azúcar y leche), sobre la bioaccesibilidad de cadmio usando digestión gastrointestinal *in vitro*.

En esta investigación, se obtuvieron valores de bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolate entre 7 y 30% aproximadamente, donde los valores más bajos correspondieron a formulaciones de chocolate amargo (*dark chocolate*). Para evaluar el efecto de cada ingrediente, se elaboró un diseño de experimentos conforme a las composiciones típicas del chocolate y los resultados se expresaron

mediante un modelo matemático, con predicciones mayores al 95% y errores de validación del modelo menores al 11%.

El contenido de leche y de cacao fueron las variables más influyentes en el modelo planteado. Así mismo, a partir del modelo matemático propuesto se concluyó que el contenido de cacao y de leche en la formulación poseen efecto negativo y positivo, respectivamente, en los valores de bioaccesibilidad de cadmio.

Se compararon los valores de bioaccesibilidad de cadmio con los obtenidos en otras matrices similares y se encontró diferencias significativas debido al tratamiento de las digestiones solo en fase gástrica, a la optimización de las concentraciones de los compuestos presentes en las digestiones o a la formulación con otros compuestos.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES DEL CACAO

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol nativo de las regiones tropicales húmedas de la parte norte de Suramérica y de Centroamérica (Motamayor *et al.*, 2002). Posee numerosos componentes bioactivos como polifenoles, que son potentes antioxidantes para la salud humana; metilxantinas y componentes precursores de aroma, en menor proporción (Perea-Villamil *et al.*, 2009; Giacometti *et al.*, 2015; Villamizar-Jaimes and López-Giraldo, 2017).

La producción de cacao es una práctica agrícola que origina productos de exportación importantes para economías en desarrollo de países en África, Asia, Oceanía, Latinoamérica y el Caribe (Jiménez Tobón, 2015). En 2017, esta producción la lideró Costa de Marfil con aproximadamente 1,9 millones de toneladas, lo que representa más del 43% de la producción mundial (ICCO, 2019).

Colombia produce aproximadamente 55 mil toneladas, cerca del 1,3% de la producción mundial (FEDECACAO, 2018). Así mismo, el 95% del cacao exportado está catalogado como cacao fino de aroma (ICCO, 2019), utilizado principalmente en la producción de chocolatería y bombonería fina. Santander es el primer productor con una participación de aproximadamente 41% de la producción nacional (FEDECACAO, 2018). Esta se obtiene principalmente de los municipios de El Carmen, San Vicente de Chucurí, Rionegro, Lebrija y Landázuri (Mojica-Pimiento and Paredes-Vega, 2006). Estos municipios poseen suelos y condiciones agroclimáticas con características apropiadas para el cultivo de cantidad y calidad (Lombana Miranda and Díaz Sánchez, 2004; Serrano Gómez, 2009); y lo desarrollan principalmente agricultores con unidades de producción de 3,3 hectáreas en promedio (Arboleda and González, 2010).

1.2 CADMIO COMO CONTAMINANTE

El cadmio (Cd) es un metal pesado clasificado como contaminante ambiental; proveniente de residuos tanto de fuentes naturales como de prácticas industriales y de agricultura (Hernández-Martínez and Navarro-Blasco, 2012). Como los metales pesados están presentes en productos alimenticios de consumo humano y animal, el contenido de Cd es un criterio indispensable a la hora de evaluar los niveles de toxicidad de los alimentos (Alexander *et al.*, 2009; Zhuravlev *et al.*, 2015).

Las fuentes de exposición humana al Cd son diversas; entre ellas sobresalen el consumo de agua y alimentos, inhalación de polvo y partículas, contacto dérmico con el suelo y la exposición al humo del tabaco (Yu *et al.*, 2017). Para no fumadores, se ha identificado que la ingestión de alimentos provenientes del suelo es la mayor fuente de exposición al Cd, cercano al 90% en comparación con otras vías (Yu *et al.*, 2017). Aunque la absorción de Cd en el organismo después de ingestión es relativamente baja, de 3 a 5%, éste es eficientemente retenido por el riñón y el hígado humano con un valor de vida media biológica muy alto entre 10 y 30 años (Alexander *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2017).

Las vías de exposición de Cd más importantes derivan de los alimentos producidos a partir de procesos agrícolas, donde la tasa de absorción de Cd del suelo a las plantas es relativamente rápida y los alimentos que se cultivan en áreas de mayor fuente de Cd, como suelos contaminados o espacios de mayor polución, son propensos a poseer elevadas concentraciones (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2008; Swartjes *et al.*, 2013).

Concentraciones significativas de Cd muestran un riesgo elevado de incidencia de diabetes (Tinkov *et al.*, 2017). Se ha evidenciado que su presencia afecta la fisiología del tejido adiposo, lo que resulta en una alteración del metabolismo de los lípidos y los carbohidratos en los adipocitos, así como en su disfunción endocrina (Tinkov *et al.*, 2017).

También se ha reportado que concentraciones de Cd en la sangre por encima de 0,6 µg/L se ven reflejadas en daños renales, hipertensión, enfermedad de Alzheimer, síntomas depresivos en no-fumadores, infartos miocardiales, infección al virus de hepatitis B e incremento de enfermedades pulmonares (Satarug *et al.*, 2017).

1.3 DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

La digestión gastrointestinal *in vitro* es un método que consiste en la transformación de alimentos en sustancias más sencillas para que estén accesibles al organismo simulado empleando reactivos en ciertas concentraciones, condiciones de pH y temperatura, y disoluciones que simulan las condiciones del tracto digestivo humano (Mounicou *et al.*, 2002; Torres-Escribano *et al.*, 2011; Gültekin-Özgüven *et al.*, 2016).

Aunque hay diversos compuestos que están presentes en las digestiones gastrointestinales *in vitro*, las enzimas son claves en los procesos de digestión; como la amilasa en la digestión oral, la pectina y la pancreatina en las digestiones gastrointestinales (Minekus *et al.*, 2014). La digestión gastrointestinal *in vitro* ayuda a determinar la bioaccesibilidad de ciertos compuestos de interés que están presentes en diversos alimentos (Francisco *et al.*, 2018).

La bioaccesibilidad es la fracción de un elemento solubilizado durante la digestión gastrointestinal que se encuentra disponible para la absorción del organismo (Torres-Escribano *et al.*, 2011). Este factor puede determinar el grado de eficiencia de absorción de un compuesto de interés que posea características bioquímicas beneficiosas o puede determinar el grado de exposición de contaminantes en alimentos de carácter nocivo o tóxico para la salud humana (Torres-Escribano *et al.*, 2011).

La digestión gastrointestinal *in vitro* se emplea ampliamente en muchos campos de la ciencia alimentaria y nutricional, ya que la realización de ensayos en humanos a menudo es costosa, requiere muchos recursos y es discutible desde el punto de vista ético (Minekus *et al.*, 2014). Como consecuencia, las alternativas *in vitro* que determinan objetivos finales como la bioaccesibilidad de nutrientes, metales pesados o la digestibilidad de los macronutrientes (por ejemplo, lípidos, proteínas y carbohidratos) se utilizan para detectar y construir nuevas hipótesis (Alves *et al.*, 2018).

1.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectroscopia de absorción atómica es una técnica analítica que permite evaluar la concentración de un elemento químico en una muestra basándose en los fenómenos de absorción de energía de los átomos (Skoog *et al.*, 2001; Mohammed *et al.*, 2018). En esta técnica, los electrones de los átomos en el atomizador pueden ser excitados a orbitales de más energía por un instante mediante la absorción de una cantidad de energía (con cierto valor de longitud de onda) (Skoog *et al.*, 2001). Esta cantidad de energía es característica de cada elemento químico y, en general, cada longitud de onda corresponde a un solo elemento (Skoog *et al.*, 2001; Merten and Johnson, 2018).

Como la cantidad de energía que se pone en la llama es conocida y la cantidad restante de energía que sale el detector se puede medir, es posible, a partir de la ley de Beer-Lambert, calcular cuántas de estas transiciones tienen lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide (Skoog *et al.*, 2001; Mohammed *et al.*, 2018).

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 CADMIO EN CACAO Y DERIVADOS

Se ha determinado la presencia de Cd en granos, hojas, suelos de cultivos y en productos derivados del cacao; en la mayoría de los casos, la concentración de Cd en los granos de cacao cultivados en diferentes regiones de Latinoamérica superan el límite que estipula la Unión Europea (Tabla 1) (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2011).

Tabla 1. Niveles máximos permitidos de Cd en cacao y subproductos estipulados por la Unión Europea.

Cacao y sus productos derivados	Concentración máxima permitida, mg/kg
Chocolate de leche con <30% de sólidos de cacao seco total.	0,10
Chocolate de leche con contenido de sólidos de cacao seco total $\geq 30\%$ y <50%.	0,30
Chocolate de leche con $\geq 50\%$ de sólidos de cacao seco total.	0,80
Polvo de cacao vendido al consumidor.	0,60

En 2003, Mounicou y colaboradores. reportaron concentraciones de Cd y plomo (Pb) en cacao y sus productos provenientes de diversas regiones geográficas, en donde para Malasia, Venezuela y Ecuador determinaron concentraciones de Cd en polvo de cacao de 0,602, 1,833 y 0,738 mg/kg, valores que superan los límites permitidos por la reglamentación europea (Mounicou *et al.*, 2003).

En 2010, Martínez y Palacio evaluaron, por espectrofotometría de absorción atómica de llama, la medición de Cd y Pb en suelos y granos frescos y fermentados de cultivos de cacao de San Vicente de Chucurí, sus resultados muestran niveles

de Cd mayores a los estipulados por las normas europeas (Figura 1) (Martínez and Palacio, 2010).

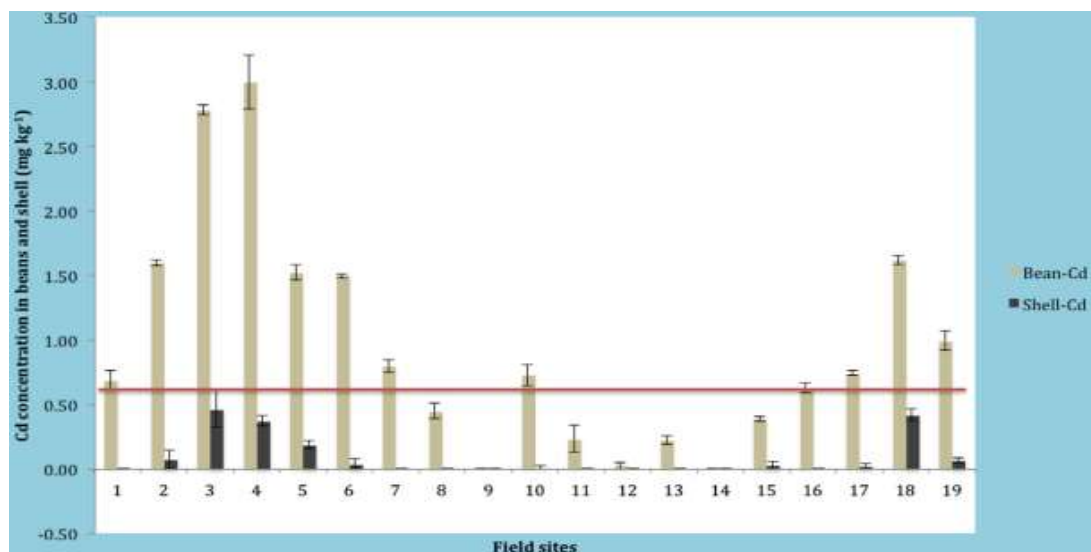
Figura 1. Concentración de Cd en muestras de cacao en varias fincas de San Vicente de Chucurí (Martínez y Palacio, 2010).



En 2015, Chávez y colaboradores reportaron el contenido de Cd en suelos y plantas de cultivos de cacao en Ecuador (Chávez *et al.*, 2015). En el suelo, se encontró que hay una mayor acumulación de Cd en la superficie que a mayores profundidades, con un valor promedio de 1,54 mg/kg, valor por encima 0,43 mg/kg, nivel crítico definido por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) para suelos agrícolas (Chávez *et al.*, 2015).

Además, se encontró que la concentración de Cd en los granos de cacao en diecinueve regiones de Ecuador está, en promedio, 0,94 mg/kg por encima del permitido por la comunidad europea. Cabe destacar que, en todos los casos, el contenido de Cd en los granos siempre fue mayor que en la cáscara; este resultado muestra que el Cd tiende a acumularse en zonas preferenciales de la planta (Figura 2) (Chávez *et al.*, 2015).

Figura 2. Niveles de Cd en grano y cáscara de cacao de diecinueve regiones de Ecuador (Chávez et al., 2015).

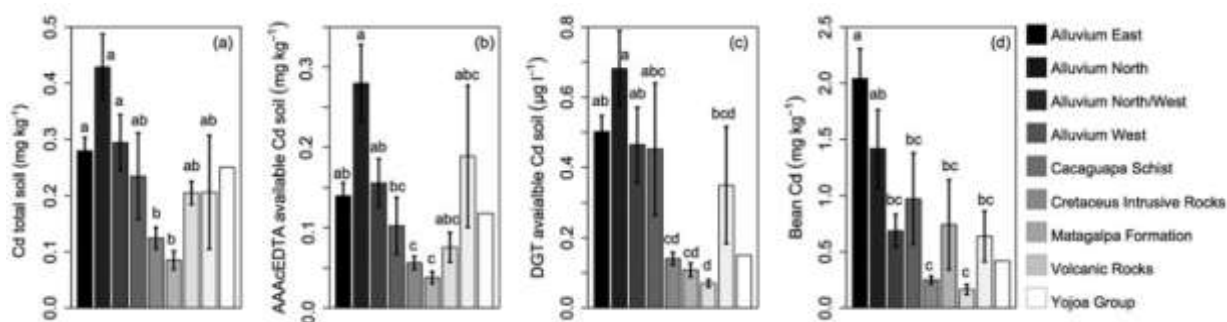


En 2016, Echeverry y Reyes reportaron concentraciones de Cd de 4,05 mg/kg en chocolates amargos (con 65% de cacao) comprados en supermercados colombianos, valores muy por encima del límite permitido por la Unión Europea (0,8 mg/kg) (Echeverry and Reyes, 2016).

En el mismo año, Gramlich y colaboradores publicaron el contenido de Cd en suelos, hojas y granos de cultivos de cacao de la región de Alto Beni, Bolivia; donde mostraron que tanto en sistemas agroforestales como de monocultivo no hay una diferencia significativa del contenido de Cd; sin embargo, determinaron que en algunos agroforestales hay un ligero incremento en la competición por la captación de Cd, por consiguiente, el contenido en las hojas y en el grano de cacao es relativamente menor (Gramlich *et al.*, 2016).

En 2017, Gramlich y colaboradores realizaron la cuantificación del contenido de Cd en hojas, cascarillas y granos provenientes de varias regiones de Honduras, donde los granos de cacao poseen valores de concentración de Cd promedio de 1,1 mg/kg, valor que supera el máximo permitido por las normas europeas (Figura 3) (Gramlich *et al.*, 2018).

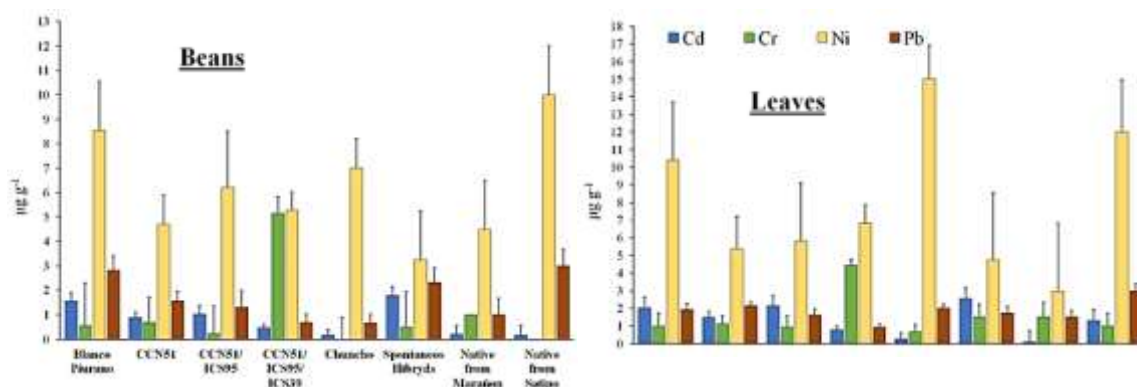
Figura 3. Contenido de Cd en el suelo, hojas y grano en varias regiones de Honduras (Gramlich *et al.*, 2018).



También relacionaron estos valores con las características del suelo de cultivo, concluyendo que el factor predominante en el contenido de Cd en el grano es el contenido en el suelo, y en menor proporción el pH y las características geológicas (Gramlich *et al.*, 2018). Además, los suelos con fertilizante o cercanos a sitios industriales no son influyentes en la variación de la concentración de Cd en el suelo (Gramlich *et al.*, 2018).

Arévalo-Gardini y colaboradores publicaron, en 2017, concentraciones de Cd en hojas y granos de cultivos de cacao en el norte, centro y sur de Perú utilizando espectrofotometría de absorción atómica de llama (Arévalo-Gardini *et al.*, 2017). Estos resultados mostraron altos niveles en las muestras de las regiones de Amazonas, Piura y Tumbes; además de que mostraron que la bioacumulación del Cd entre diferentes clones de cultivos posee diferencias significativas (Figura 4) (Arévalo-Gardini *et al.*, 2017).

Figura 4. Contenido de Cd en granos y hojas de cacao de diferentes genotipos provenientes de Perú (Arévalo-Gardini *et al.*, 2017).



En Colombia, no hay una legislación para el control del Cd en el cacao (Jiménez Tobón, 2015), pese a esto, altos contenidos de Cd podrían limitar la exportación del grano a clientes de la unión europea; quienes aprecian los granos de cacao producidos por sus cualidades de fino y de aroma (ICCO, 2019).

En 2015, Jiménez Tobón resalta en su artículo la importancia de una legislación en el monitoreo y control de Cd en las plantaciones de cacao en países productores, especialmente Colombia, debido a que parte de la producción de cacao es destinada a exportación a países en donde la legislación está vigente (Jiménez Tobón, 2015). En Latinoamérica, solo Argentina y Uruguay poseen legislación sobre los valores máximos permitidos de Cd en productos provenientes del cacao (Jiménez Tobón, 2015).

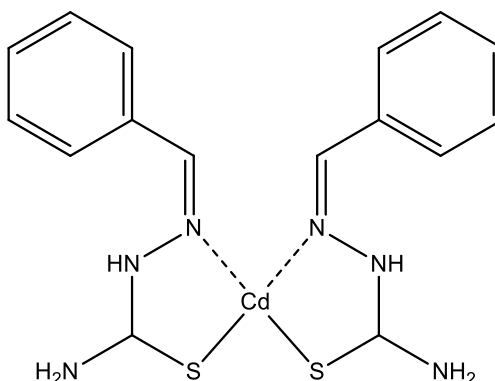
2.2 DETERMINACIÓN DE CADMIO

Se ha determinado concentraciones de Cd en diferentes matrices, usando diferentes metodologías para la preparación de la muestra y la cuantificación de metales pesados utilizando diversas técnicas analíticas.

En 2008, Reddy y colaboradores publicaron un método espectrofotométrico extractivo para la determinación del contenido de Cd en hojas medicinales y en

muestras ambientales utilizando como acomplexante colorimétrico bencilditiosemicarbazona (BDTSC) (Figura 5) (Reddy *et al.*, 2008). Se reportó que este método extractivo, de los pocos que se encuentra en literatura, es sensible y reproducible, además de mejorar la selectividad usando agentes que suprimen la interferencia de varios metales de transición en solución (Reddy *et al.*, 2008).

Figura 5. Estructura del complejo de Cd^{2+} con BDTSC (Reddy *et al.*, 2008).

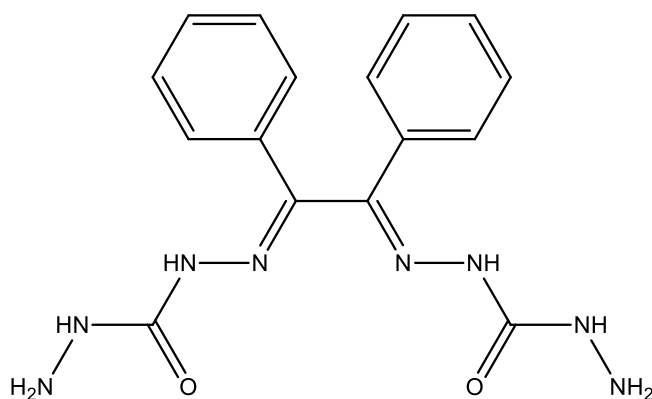


En 2012, Hernández y Navarro reportaron valores de concentraciones de Cd y Pb en cereales infantiles orgánicos y convencionales provenientes de España, utilizando espectrofotometría de absorción atómica (Hernández-Martínez and Navarro-Blasco, 2012). Los intervalos de concentración de Cd estuvieron entre 16,56 – 28,50 mg/kg para cereales orgánicos y entre 4,40 – 11,77 mg/kg para cereales convencionales; donde tres de las muestras analizadas reportaron valores superiores a la legislación europea (Hernández-Martínez and Navarro-Blasco, 2012). También demostraron que los productos enriquecidos con cacao incrementan la concentración de Cd en el cereal (Hernández-Martínez and Navarro-Blasco, 2012).

En 2014, Yanus y colaboradores reportaron concentraciones de ocho metales, incluyendo Cd, en chocolate, granos de cacao y sus productos de diferentes marcas y países por la técnica de plasma de acoplamiento inductivo con espectrómetro de masas (ICP-MS), donde reportaron resultados entre 3,1 y 141 ng/g (Yanus *et al.*, 2014).

En el mismo año, Chandra y colaboradores reportaron una metodología para la determinación del contenido de Cd en muestras de chocolate utilizando electrodos selectivos de membrana de policloruro de vinilo (PVC). (Chandra *et al.*, 2014) La membrana posee como portador del ion de Cd^{2+} bencilbis(carbohidrazona) (BBC) (Figura 6) que le da una sensibilidad y selectividad al ion Cd^{2+} por encima de otros iones metálicos, además de poseer tiempos de respuesta muy rápidos y utilidad de aproximadamente de 10 semanas (Chandra *et al.*, 2014).

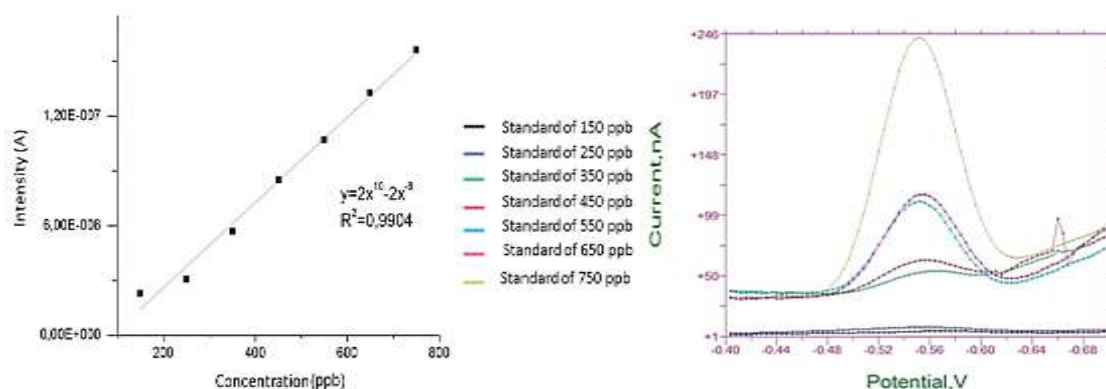
Figura 6. Estructura del acomplexante bencilbis(carbohidrazona) (Chandra *et al.*, 2014).



Zhuravlev y colaboradores reportaron, en 2014, la optimización de parámetros de operación, características analíticas y ventajas de la determinación de Cd y otros metales en aceites vegetales y muestras de grasas por espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica directa con horno de grafito (Zhuravlev *et al.*, 2015). Ellos obtuvieron límites de detección para el Cd de 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y desviaciones estándar relativas (RSD) entre 3 y 8% (Zhuravlev *et al.*, 2015).

En 2016, Chaparro Acuña y colaboradores documentaron la determinación del contenido de Cd en chocolate de mesa en polvo y granulado proveniente de Chiquinquirá, Colombia, empleando el método de voltamperometría diferencial de pulso de redisolución anódica (Chaparro Acuña *et al.*, 2017). Esta metodología posee una sensibilidad del orden en 10^{-3} ppm, coeficientes de correlación lineal mayores que 0,95 (Figura 7) y RSD menores que 10% (Chaparro Acuña *et al.*, 2017).

Figura 7. Curva de calibración y voltamperograma de patrones de Cd (Chaparro Acuña *et al.*, 2017).



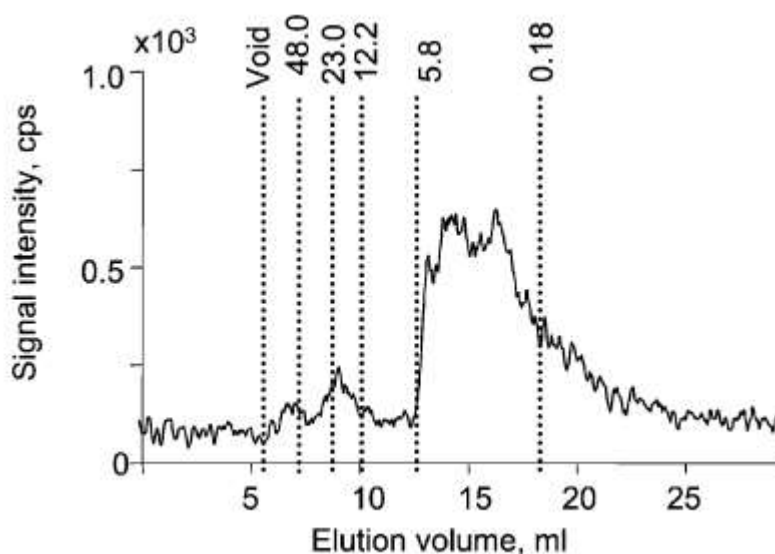
En 2018, Lo Dico y colaboradores reportaron concentraciones de siete metales, incluyendo Cd, en polvo de cacao y chocolate provenientes de supermercados de Italia por ICP-MS; donde la metodología fue implementada evaluando varias figuras de mérito obteniendo excelentes criterios de aceptación (Lo Dico *et al.*, 2018). En esta investigación se reportaron niveles de Cd en polvos de cacao y chocolates por debajo de la normativa europea (Lo Dico *et al.*, 2018).

2.3 BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO

Aunque se ha determinado la cantidad total de Cd en diferentes matrices, es importante destacar el papel de su bioaccesibilidad. Numerosas investigaciones se han enfocado en el estudio de la bioaccesibilidad de los metales pesados para diversas matrices de alimentos.

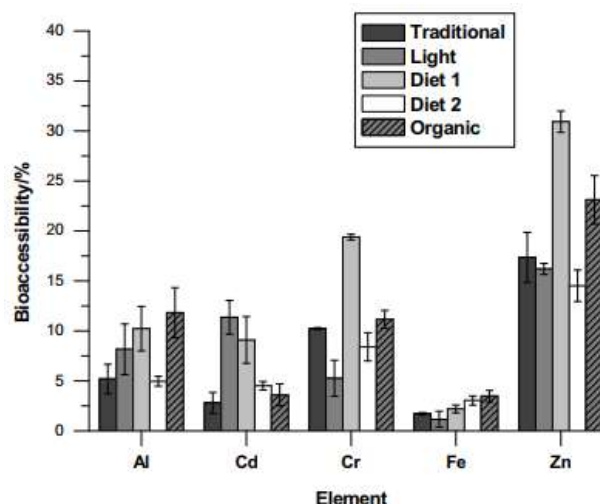
Mounicou y colaboradores en 2002 reportaron una técnica para monitorear las especies químicas que se forman con el Cd y Pb en sistemas simulados de digestión gastrointestinal de polvo de cacao (Mounicou *et al.*, 2002). En la Figura 8 se muestra un cromatograma de las especies químicas que se forman con Cd y se observa que el Cd extraído se eluye como una mezcla de especies de bajo peso molecular (hasta 6000 Da) (Mounicou *et al.*, 2002).

Figura 8. Cromatograma SEC-ICP-MS de un extracto de polvo de cacao (^{114}Cd) con fluido gastrointestinal simulado (Mounicou et al., 2002).



Peixoto y colaboradores publicaron, en 2016, el estudio de los factores que afectan la bioaccesibilidad de 10 elementos presentes en bebidas achocolatadas; donde encontraron que la bioaccesibilidad del Cd varía según el tipo de muestra, siendo mayor en la formulación *light*, aproximadamente 11% (Figura 9) (Peixoto et al., 2016). También se encontró que a concentraciones de sales biliares mayores, la bioaccesibilidad del Cd aumenta 3 veces más (Peixoto et al., 2016). Tanto el pH como la presencia de lipasa en la digestión gastrointestinal *in vitro* no varía significativamente la bioaccesibilidad del Cd (Peixoto et al., 2016).

Figura 9. Bioaccesibilidad de Al, Cd, Cr, Fe y Zn del polvo de bebida de chocolate según la formulación (Peixoto *et al.*, 2016).



En 2017, Barraza y colaboradores determinaron la bioaccesibilidad gástrica humana en grano de cacao crudo y en licor de cacao (Barraza *et al.*, 2017). Ellos reportaron que entre el 90% y 100% del Cd presente en el grano de cacao y en los licores es bioaccesible en las digestiones gástricas *in vitro* (Barraza *et al.*, 2017). En esta investigación también se reportaron concentraciones de Cd en raíces, hojas y cáscaras de cacao donde algunas de ellas superan valores de 1 mg/kg (Barraza *et al.*, 2017).

Sin embargo, no hay estudios que evalúen el efecto de los componentes de las formulaciones en productos de chocolate sobre la bioaccesibilidad de Cd o de algún otro metal.

Asimismo, se han estudiado factores externos que pueden afectar los valores de bioaccesibilidad de metales realizando otras formulaciones de los productos o someterlos a tratamientos físicos previos.

En 2016, Zhuang y colaboradores publicaron la influencia de la cocción en la bioaccesibilidad del Cd y Arsénico (As) en diversos tipos de arroz; según sus resultados, se reduce significativamente los valores de bioaccesibilidad de Cd

cuando se realiza cocción hasta secado con volúmenes de agua bajos (Zhuang *et al.*, 2016).

En 2018, Bhat y colaboradores publicaron el efecto de la aplicación de un campo eléctrico pulsado (PEF) en la biodisponibilidad de proteínas y minerales de la carne de venado (Bhat *et al.*, 2019). En este estudio, se observó un incremento significativo en la digestibilidad proteica, en proteínas solubles y en disponibilidad de aminoácidos libres; esto hace que la técnica PEF sea útil en procesamiento de carne y en el desarrollo de nuevas estructuras de proteínas y alimentos con digestibilidad mejorada (Bhat *et al.*, 2019). Sin embargo, se observó un descenso en la disponibilidad de minerales esenciales y un ligero aumento en metales pesados como Cd (Bhat *et al.*, 2019).

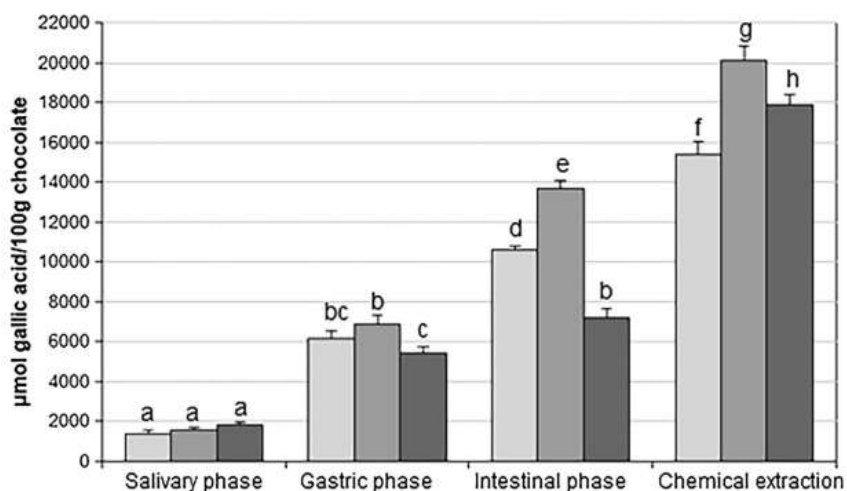
Gültekin-Ozgüven y colaboradores, en 2016, reportaron valores de bioaccesibilidad de procianidinas en digestiones gastrointestinales *in vitro* del grano de cacao, licor de cacao y polvo de cacao (Gültekin-Özgüven *et al.*, 2016). En esta investigación se observó una bioaccesibilidad de las procianidinas entre el 65 y 70% tanto en las digestiones gástricas como en las intestinales, donde no se observó diferencias significativas entre el licor de cacao y el polvo de cacao (Gültekin-Özgüven *et al.*, 2016). Los autores concluyen que la diferencia del contenido de grasa en las matrices evaluadas no afecta a la bioaccesibilidad de las procianidinas (Gültekin-Özgüven *et al.*, 2016).

Sin embargo, Toro y colaboradores argumentan un bajo porcentaje de bioaccesibilidad de procianidinas debido a la oxidación de éstas en la fase pancreática de la digestión. Además, solo existen procianidinas de cierto grado de polimerización que son realmente bioaccesibles, haciendo que la bioaccesibilidad de ellas sea muy selectiva (Toro-Urbe *et al.*, 2019).

Martini y colaboradores publicaron, en 2018, resultados de bioaccesibilidad, bioactividad y metabolismo celular de compuestos fenólicos en distintas formulaciones de chocolate sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro* (Martini *et*

al., 2018). En estos resultados se puede observar que las digestiones gastrointestinales *in vitro* muestran una biodisponibilidad de los polifenoles presentes en el chocolate entre 38 y 71%; así mismo se evidenció que el enriquecimiento con otros ingredientes modifica la concentración de estos (Figura 10) (Martini *et al.*, 2018).

Figura 10. Cambios en el contenido fenólico total durante la digestión gastrointestinal *in vitro* del chocolate negro (gris claro), chocolate negro con hojas de té (gris) y chocolate negro con cúrcuma (gris oscuro) (Martini *et al.*, 2018).



3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la bioaccesibilidad de Cd en formulaciones de chocolatería con concentraciones de componentes diferentes usando digestiones gastrointestinales *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la bioaccesibilidad de Cd por digestión gastrointestinal *in vitro* de las formulaciones de chocolate empleadas en el diseño de experimentos.
- Correlacionar las diferencias del porcentaje de bioaccesibilidad de Cd de las formulaciones de chocolate con los componentes principales (cacao, leche, azúcar y contenido de Cd total en el cacao).
- Proponer una formulación de chocolate que posea el menor valor de bioaccesibilidad de Cd.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REACTIVOS Y MUESTRAS

Las muestras de cacao fermentado y seco se obtuvieron de los municipios San Vicente de Chucurí y El Carmen de Chucurí, los cuales son los mayores productores de cacao en el departamento. Se tomaron seis veredas a través de todo el municipio realizando un muestreo aleatorio simple. Se escogieron muestras con la concentración de Cd entre 1 y 10 mg/kg y a una altitud entre 550 y 1400 m.s.n.m.

Los reactivos para el procedimiento de digestión gastrointestinal *in vitro* y la cuantificación de Cd fueron pepsina de mucosa gástrica porcina, pancreatina de páncreas porcino, soluciones estándar de sales biliares, carbonato de amonio y ácido nítrico concentrado. Toda el agua que se utilizó en el desarrollo de la investigación fue ultrapura (0,056 $\mu\text{S}/\text{cm}$) tipo 1.

4.2 PREPARACIÓN DE COBERTURAS

4.2.1 Diseño para la preparación de las formulaciones. Las coberturas de chocolate para las digestiones gastrointestinales *in vitro* se fabricaron, basado en la Resolución 1511 del INVIMA (Ministerio de la Protección Social, 2011), usando un diseño de experimentos 2^4 más puntos centrales con cuatro factores que describen los componentes principales de la formulación de cacao (Tabla 2) con un total de 96 experimentos, teniendo el valor de % de bioaccesibilidad de Cd como variable de respuesta. El diseño de experimentos se ejecutó y se analizó mediante el software Statistica. La cuantificación de Cd total se realizó por Espectroscopia de Absorción Atómica en llama.

Tabla 2. Descripción de los factores y sus niveles para el diseño de experimentos.

Factores	Nivel mínimo	Nivel máximo	Respuesta
Concentración de Cd, mg/kg	1,23	9,11	% bioaccesibilidad de Cd
Licor de cacao, g	3	7	
Leche en polvo, g	0	4	
Azúcar, g	2	4	

4.2.2 Cuantificación de Cd total. Se cuantificó el contenido de Cd total presente en las coberturas de chocolate basado en el procedimiento de Echeverry y Reyes (Echeverry and Reyes, 2016). Se calcinó aproximadamente 3 g de la muestra en una mufla a 600 °C durante 4 horas. Luego, se disolvió en 10 mL de HCl 6 N y se llevó a ebullición por 5 min. Por último, se filtró el contenido con papel filtro, se adicionó 3 gotas de HNO₃ al 65%, y se aforó a 25 mL. Las soluciones resultantes se analizaron por Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) en llama utilizando un equipo PinAAcle 400 Perkin-Elmer y con las siguientes características: gas de combustión aire-acetileno a una presión de 2,5 Pa y un flujo de 1 L/min. La absorbancia de las muestras se leyó directamente a una longitud de onda de 254 nm.

4.3 DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

Los ensayos de digestión gastrointestinal *in vitro* se desarrollaron siguiendo el procedimiento descrito por Minekus y colaboradores con algunas modificaciones (Minekus *et al.*, 2014). A continuación, se describirán brevemente cada uno de los pasos que se siguieron.

4.3.1 Preparación de soluciones estándar. Para la digestión gastrointestinal *in vitro*, se prepararon soluciones estándar electrolíticas que simulaban los fluidos de la digestión gástrica y digestión pancreática. Las soluciones estándar se prepararon con los siguientes reactivos y sus respectivas concentraciones (Tabla 3). Para ajustar y mantener el pH de las soluciones como fluidos de las digestiones, se utilizó NaOH 1 M y HCl 6 M.

Tabla 3. Composición de las soluciones utilizadas como fluidos de las digestiones.

Constituyentes	Concentración en solución de fluido gástrico (SFG), mM	Concentración en solución de fluido pancreático (SFP), mM
	pH 3	pH 7
KCl	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	0,9	0,8
NaHCO ₃	25	85
NaCl	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,1	0,33
(NH ₄)Cl	0,5	-

4.3.2 Digestión gástrica *in vitro*. Para la digestión gástrica *in vitro*, se pesó aproximadamente 5 g de cada formulación de chocolate y se mezcló con 7,5 mL de SFG, se adicionaron 1,6 mL de solución de pepsina porcina de 25000 U/mL (se disolvió la pepsina en SFG), 5 µL de CaCl₂ 0,3 M y 0,8 mL de HCl 1 M para llegar a pH 3. Todo el procedimiento se realizó durante 2 horas con agitación constante, controlando la temperatura entre 36 y 37 °C y un valor de pH entre 2,9 y 3,1.

4.3.3 Digestión pancreática *in vitro*. Para la digestión pancreática *in vitro*, se adicionaron 11 mL de SFP a la solución resultante de la anterior digestión, luego se adicionaron 5 mL de solución de pancreatina de 800 U/mL (se disolvió la pancreatina con SFP), 2,5 mL de bilis al 0,5%, 40 µL de CaCl₂ 0,3 M, 0,8 mL de NaOH 1 M para llegar a pH 7 y 0,3 mL de agua. Todo el procedimiento se realizó durante 2 horas con agitación constante, controlando la temperatura entre 36 y 37 °C y un valor de pH entre 6,9 y 7,1.

4.3.4 Concentración de Cd bioaccesible. La determinación del contenido de Cd bioaccesible se basó en la metodología propuesta por Barraza y colaboradores con algunas modificaciones (Barraza *et al.*, 2017). Se adicionó el contenido resultante de la digestión pancreática a un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Luego, se adicionó el sobrenadante a un vaso precipitado de 100 mL, se adicionaron 5 gotas de HNO₃ al 65%, se agitó un poco hasta observar un precipitado y se filtró el contenido con papel filtro recogiendo el filtrado en un balón aforado de 50 mL. Por último, se aforó la solución a 50 mL y se analizó por AAS en llama utilizando como gas de combustión aire-acetileno a las mismas condiciones descritas en el numeral 4.2.2.

4.3.5 Determinación de la bioaccesibilidad del Cd. Se determinó la bioaccesibilidad del Cd a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ bioaccesibilidad de Cd} = \frac{[Cd_{bioaccesible}]}{[Cd_{total}]} * 100$$

Donde $[Cd_{bioaccesible}]$ corresponde al contenido de Cd presente en la solución resultante de la digestión gastrointestinal sobre la cantidad de la formulación de chocolate utilizada en la digestión; y $[Cd_{total}]$ corresponde a la concentración del Cd total de la formulación de chocolate.

4.4 CORRELACIÓN DE BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO CON COMPONENTES DE FORMULACIONES

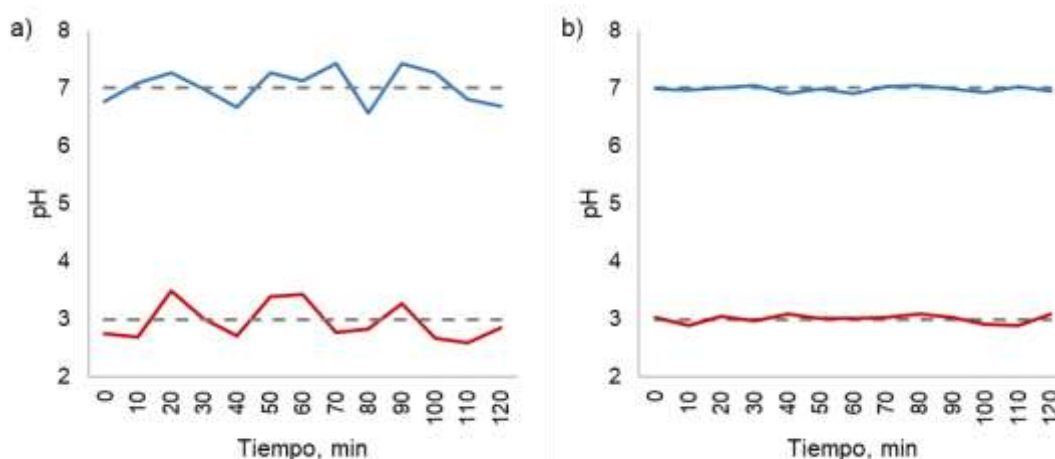
Para determinar la correlación entre los componentes en las formulaciones de chocolate y la bioaccesibilidad de Cd, se realizó un análisis ANOVA a los resultados obtenidos. También se evaluó por medio de superficie de respuesta, gráficas de Pareto y correlación de datos predichos con observados. Se realizó un ajuste de la ecuación que describió el % de bioaccesibilidad de Cd en función de los factores evaluados que fueron significativos (cacao, azúcar, leche en polvo y concentración de Cd en cacao). Empleando esta ecuación se procedió a determinar las concentraciones de los componentes de la formulación de chocolate que posea menor valor en la bioaccesibilidad de Cd.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PRUEBAS PRELIMINARES

Se realizaron pruebas preliminares para determinar las condiciones de la digestión gastrointestinal *in vitro* adecuadas para la posterior cuantificación de Cd bioaccesible. Se modificaron la composición de las soluciones electrolíticas y la concentración de HCl que se utilizó para mantener el pH de las digestiones fue de 1 M. Con estos cambios se logró un mejor control del pH durante las digestiones (Figura 11).

Figura 11. Valores de pH a través de la digestión gástrica (línea roja) y pancreática (línea azul) donde a) metodología de Minekus sin modificaciones; y b) metodología de Minekus con las modificaciones empleadas.



A partir de ellas se infiere que las modificaciones implementadas en este trabajo condujeron a mantener un pH de $3,0 \pm 0,1$ y $7,0 \pm 0,1$ para las digestión gástrica y pancreática, respectivamente. Un control estricto del pH es importante debido a que fluctuaciones por encima de 0,1 puede variar la actividad de la pepsina, lo que conduciría a subestimar o sobreestimar el porcentaje bioaccesibilidad del Cd (Peixoto *et al.*, 2016).

En este trabajo se determinó el contenido de Cd en los componentes que fueron usados posteriormente en las formulaciones, donde se corroboró que solo el cacao contribuye al contenido de Cd total en las formulaciones de chocolate.

5.2 EFECTO DE LOS COMPONENTES

Se determinó el % de bioaccesibilidad de Cd de cada una de las formulaciones de chocolate preparadas de acuerdo con el diseño de experimentos empleado (Anexo A). En la Tabla 4 se aprecia que el valor promedio del % de bioaccesibilidad de Cd fue de 19,61%; y los valores máximo y mínimo fueron de 32,56 y 7,22% respectivamente.

Tabla 4. Aparte del Anexo A. Tabla de resultados.

Experimento	[Cd] en cacao, mg/kg	Cacao, g	Leche, g	Azúcar, g	[Cd] total, mg/kg	[Cd] bioaccesible, mg/kg	Bioaccesibilidad de Cd, %
1	1,23	3,00	0,00	2,00	0,74	0,14	18,92
2	1,23	3,00	0,00	4,00	0,53	0,10	18,87
12	1,23	7,00	0,00	2,00	0,97	0,07	7,22
13	1,23	7,00	0,00	4,00	0,80	0,08	10,00
84	9,11	3,00	4,00	2,00	3,01	0,98	32,56
85	9,11	3,00	4,00	4,00	2,56	0,60	23,44
95	9,11	7,00	4,00	2,00	4,89	1,11	22,70
96	9,11	7,00	4,00	4,00	4,26	0,80	18,78
Promedio							19,61

Estos valores muestran la influencia de la formulación sobre el porcentaje de bioaccesibilidad de Cd; por tal motivo, es importante determinar las cantidades de cacao, leche y azúcar, y la concentración de Cd en el cacao adecuadas para la

elaboración de formulaciones de chocolate con menores valores de % de bioaccesibilidad de Cd.

Los datos se ajustaron a una ecuación de efectos lineales con interacciones como se presenta en la siguiente ecuación.

$$Y = X_0 + X_A A + X_B B + X_C C + X_D D + X_{AB} AB + X_{AC} AC + X_{AD} AD + X_{BC} BC + X_{BD} BD + X_{CD} CD$$

Donde Y es el % de bioaccesibilidad de Cd, X_n es el coeficiente de cada variable y A, B, C y D son las variables de cantidad de cacao, leche en polvo, azúcar y concentración de Cd en cacao respectivamente.

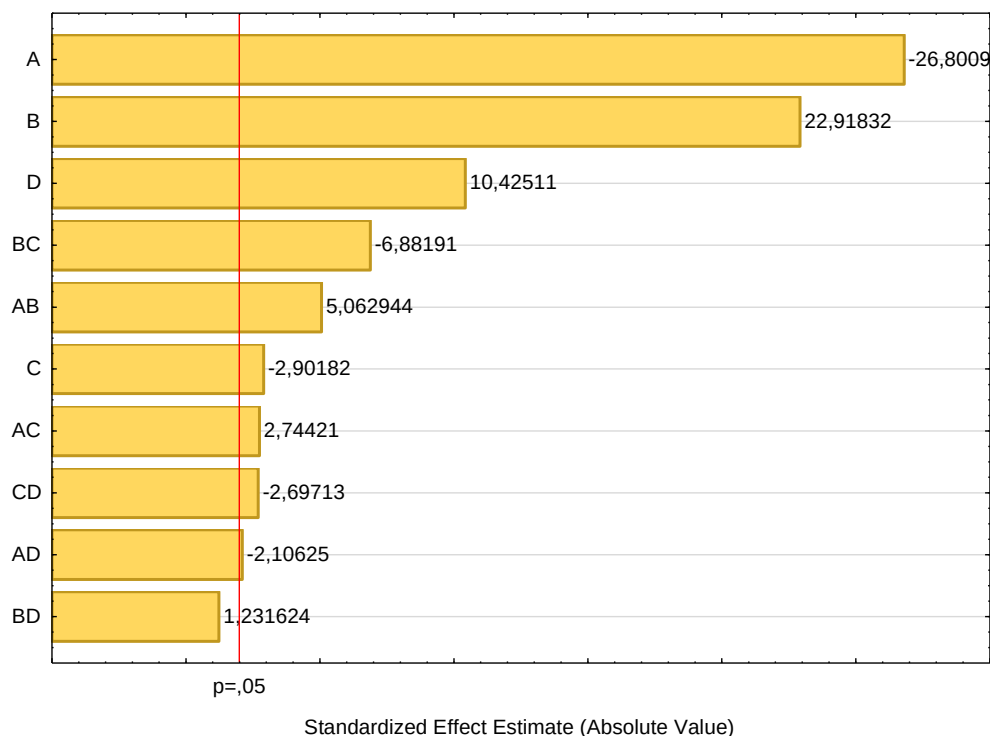
Se realizó un análisis estadístico ANOVA a los valores obtenidos (Anexo A) enmarcados en el modelo de la ecuación anterior para comparar la significancia de las variables en el modelo (Tabla 5). También se analizaron los efectos estandarizados de las variables del modelo a través del diagrama de Pareto (Figura 12).

Tabla 5. Resultado ANOVA de las variables del modelo inicial planteado.

Factor	Suma de cuadrados (SS)	Valor F	Valor P
A: Cacao, g	1181,112	718,2899	0,000000
B: Leche, g	863,688	525,2495	0,000000
C: Azúcar, g	13,846	8,4206	0,004723
D: [Cd] cacao, mg/kg	178,712	108,6829	0,000000
AB	42,150	25,6334	0,000002
AC	12,383	7,5307	0,007399
AD	7,295	4,4363	0,038131
BC	77,877	47,3607	0,000000
BD	2,494	1,5169	0,221486
CD	11,962	7,2745	0,008432
Error	139,769		
Total SS	2622,307		

Al comparar el valor P de cada variable (Tabla 5) se puede apreciar que solo la interacción BD, que corresponde a la cantidad de leche y a concentración de Cd en el cacao, no tiene efecto significativo (valor $P > 0,05$). Asimismo, se observa que las variables correspondientes a la cantidad de cacao y de leche son las que mayor influencia posee en el modelo inicial propuesto.

Figura 12. Diagrama de Pareto con los valores absolutos de los efectos estandarizados estimados para el modelo inicial planteado en la ecuación. Las variables A, B, C y D corresponden a cantidad de cacao, leche en polvo, azúcar y concentración de Cd en cacao respectivamente.

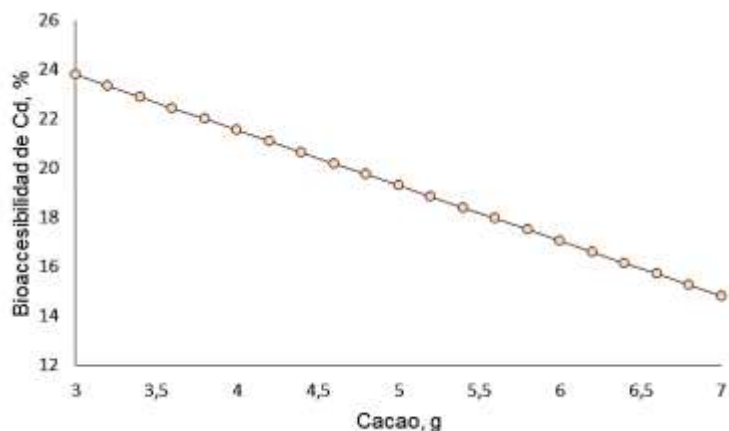


Los efectos estandarizados del modelo inicial propuesto se pueden observar en el diagrama de Pareto (Figura 12). En la figura se corrobora que las variables correspondientes a cantidad de cacao y de leche son las de mayor influencia en el modelo. Sin embargo, la cantidad de cacao (que posee la mayor influencia en el modelo) tiene un efecto negativo en el % bioaccesibilidad de Cd, mientras que la cantidad de leche y la concentración de Cd en cacao posee un efecto positivo, observándose en el signo negativo y positivo de cada efecto estandarizado, respectivamente (Figura 12).

Efecto de la cantidad de cacao

A mayor cantidad de cacao en las formulaciones, teniendo constantes las demás variables de la formulación, el % de bioaccesibilidad disminuye (Figura 13).

Figura 13. Gráfica de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de cacao, manteniendo las otras variables fijas a mitad del valor.



Como se mencionó en la sección de pruebas preliminares, sólo el cacao aporta en el contenido de Cd total de las formulaciones; por lo tanto, a mayor cantidad de cacao utilizado en la formulación, mayor contenido de Cd total en la formulación. Siguiendo la misma lógica, se esperaría que, a mayor cantidad de cacao, mayor contenido de Cd en la fase bioaccesible después de la digestión gastrointestinal; sin embargo, este efecto es contrario. Una de las razones por las que el efecto de la cantidad de cacao en el % de bioaccesibilidad de Cd sea inverso se debe, en parte, a la presencia de grasa en el cacao.

En efecto, la presencia de componentes no polares (grasa) en las formulaciones de chocolate impide la liberación de metales y moléculas polares en la fase polar y disminuye la probabilidad de ser bioaccesibles después de la digestión gastrointestinal (Martini *et al.*, 2018). Además, en la digestión pancreática hay presencia de bilis, que contribuye a la disolución y degradación de las grasas. La degradación de éstas producen compuestos más pequeños que pueden atrapar metales o moléculas polares de menor tamaño en forma de micelas o complejos

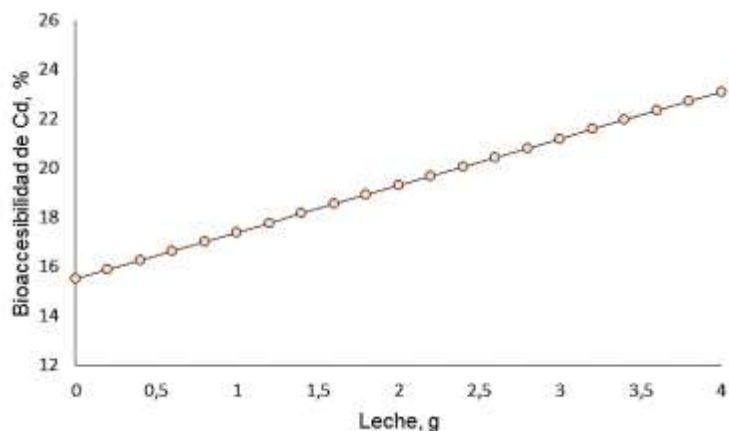
que se vuelven insolubles en la digestión y, por ende, puede disminuir la concentración de Cd bioaccesible después de la digestión gastrointestinal (Peixoto *et al.*, 2016; Barraza *et al.*, 2017).

En los ácidos grasos que constituyen los triglicéridos del cacao, cerca de una tercera parte son ácidos grasos insaturados, que corresponde entre un 17 y 20% en el cacao (Perea-Villamil *et al.*, 2009). En una pequeña proporción, los metales de transición pueden participar como catalizadores en la oxidación de ácidos grasos insaturados presentes en las formulaciones de chocolate, y la probabilidad de actuar como catalizadores en vez de estar disponibles en la matriz es mayor en matrices con alto contenido de ácidos grasos insaturados (Stohs, 1995).

Efecto de la cantidad de leche

Teniendo en cuenta la cantidad de leche en polvo que se utilizó para la elaboración de las formulaciones; a medida que este valor incrementa, tomando constantes las demás variables de la formulación (Figura 14), el % de bioaccesibilidad también incrementa.

Figura 14. Gráfica de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de leche, manteniendo las otras variables fijas a mitad del valor.



Este efecto se analizó considerando las características químicas, funcionales y estructurales que posee este componente principal.

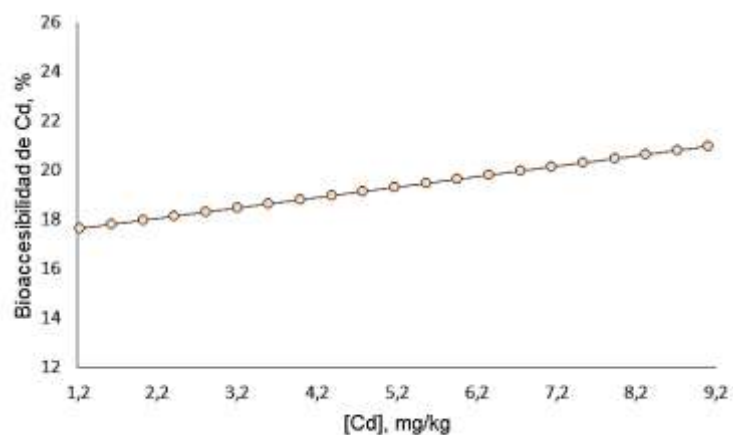
La leche en polvo posee diversos compuestos como aminoácidos, proteínas, lípidos, entre otros que pueden actuar como quelantes en metales pesados (Jenkins and McGuire, 2006). Sin embargo, la cisteína es una de las pocas moléculas que contribuye a la quelación y precipitación de los iones de Cd^{2+} (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Este efecto se debe a la afinidad del átomo de azufre con el Cd, que puede actuar en el enlace coordinado con el metal y generar complejos (Cobbett and Goldsbrough, 2002) que pueden ser insolubles en la fase bioaccesible.

A pesar de ello, el contenido de cisteína presente en la leche en polvo es muy bajo, en cambio, el contenido de otros aminoácidos polares y de ácidos orgánicos es elevado. La presencia de un componente polar de gran proporción en las formulaciones de chocolate como la leche y, sumado a esto, el alto contenido de acidez presente en ella ayuda a liberar más iones de Cd^{2+} en la fase polar y aumentar la probabilidad de ser bioaccesible después de la digestión gastrointestinal.

Efecto de la concentración de Cd en el cacao

Evaluando la concentración de Cd en el cacao que se utilizó para la elaboración de las formulaciones; a medida que este valor incrementa, teniendo constantes las demás variables de la formulación, el % de bioaccesibilidad también incrementa (Figura 15). Esto se debe a un efecto de adición de Cd en la formulación elaborada, ya que la matriz posee mayor cantidad de Cd que puede ser solubilizada y ser bioaccesible en las digestiones gastrointestinales.

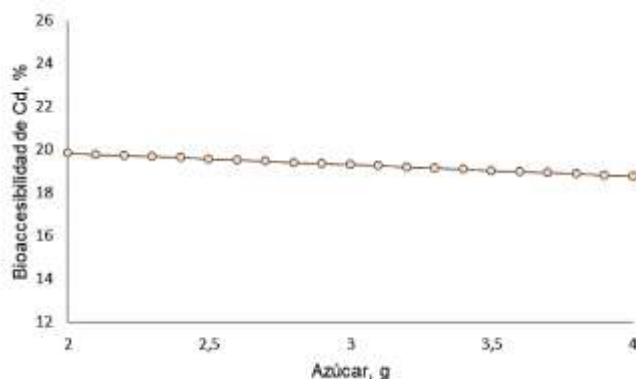
Figura 15. Gráfica de bioaccesibilidad de Cd en función de concentración de Cd en cacao, manteniendo las otras variables fijas a mitad del valor.



Efecto de la cantidad de azúcar

Para la cantidad de azúcar que se utilizó en la elaboración de las formulaciones; a medida que este valor se incrementa, teniendo constantes las demás variables de la formulación, el % de bioaccesibilidad disminuye (Figura 16). Aunque el efecto de la cantidad de azúcar es pequeño en comparación al efecto de las otras variables (Figura 12, Diagrama de Pareto), ésta es una variable significativa en el modelo inicial propuesto.

Figura 16. Gráfica de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de azúcar, manteniendo las otras variables fijas a mitad del valor.



Este efecto puede ser atribuido a la formación de complejos de Cd insolubles con la sacarosa y otros endulzantes en la fase intestinal de la digestión, reduciendo la

concentración de Cd bioaccesible y, por ende, el % de bioaccesibilidad de Cd (Peixoto *et al.*, 2016). Sin embargo, este efecto es poco pronunciado dado que la retención del Cd en la matriz alimentaria es más eficiente en presencia de otras moléculas que forman complejos con proteínas con azufre (Cobbett and Goldsbrough, 2002) o forman estructuras micelares (Peixoto *et al.*, 2016; Barraza *et al.*, 2017).

5.3 MODELO DE PREDICCIÓN

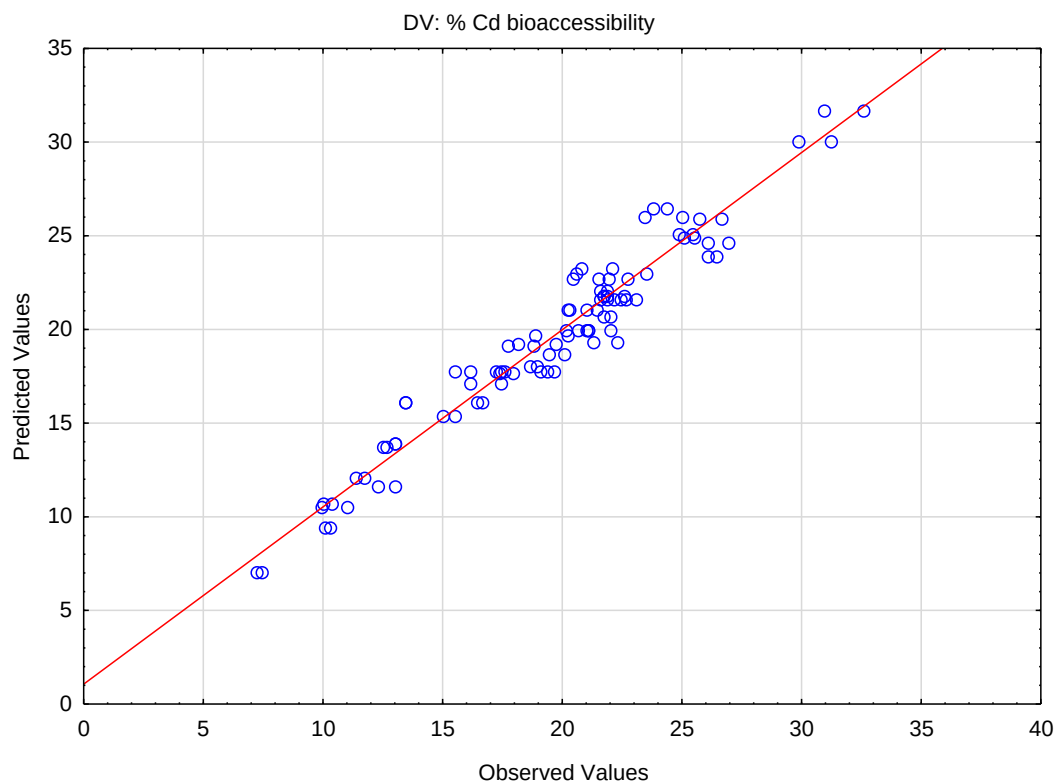
De acuerdo con lo anterior, los datos se ajustaron a un nuevo modelo corregido de efectos lineales con interacciones, eliminando la interacción BD (cantidad de leche y [Cd] en cacao) la cual no fue significativa. A continuación, se muestra la ecuación ajustada:

% Bioaccesibilidad de Cd

$$= 24,92 - 3,20A + 2,67B + 0,22C + 1,09D + 0,23AB + 0,25AC - 0,05AD \\ - 0,64BC - 0,14CD$$

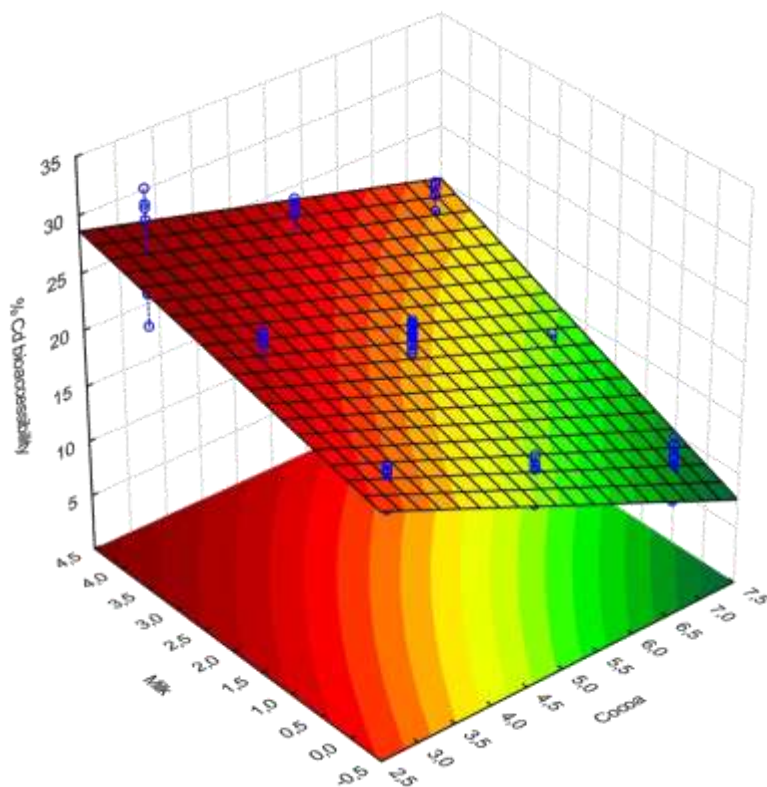
El modelo ajustado explicó el comportamiento de los datos experimentales en un 94,01% observándose una tendencia lineal entre los datos experimentales y los calculados con el modelo ajustado (Figura 17).

Figura 17. Gráfica de valores observados vs valores predichos con el modelo ajustado para el % de bioaccesibilidad de Cd.



A partir del modelo ajustado, se obtuvieron las gráficas de superficie de respuesta para la bioaccesibilidad de Cd de las formulaciones de chocolate preparadas (Figura 18 y Anexo B - F).

Figura 18. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de leche y cacao, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.



En las gráficas de superficie de respuesta se puede observar una tendencia de los datos similares a la reportada en la gráfica de Pareto, con una disminución del % de bioaccesibilidad Cd cuando la cantidad de cacao aumenta, y un aumento en la bioaccesibilidad cuando las cantidades de leche y [Cd] en el cacao aumentan.

Si bien, el contenido de azúcar es una variable significativa en el % de bioaccesibilidad de Cd, en las gráficas se puede observar que el efecto es muy pequeño, considerándose en algunas de ellas, como constante (Anexo B - F). Este efecto se puede corroborar con los valores de los efectos estandarizados de la gráfica de Pareto (Figura 12) y en la tabla ANOVA del modelo inicial planteado (Tabla 5).

5.4 VALOR MÍNIMO

Una vez obtenido el modelo matemático para describir el comportamiento del % de bioaccesibilidad de Cd en las formulaciones de chocolate; se determinaron los valores de las variables que corresponden a formulaciones con el valor mínimo de bioaccesibilidad.

A través del modelo matemático, la formulación más apropiada es de 7 g de cacao, 0 g de leche y 2 g de azúcar, utilizando un cacao de 1,23 mg/kg de Cd, con un % bioaccesibilidad de Cd de 7,07%; así mismo, otros valores mínimos se obtuvieron para formulaciones de chocolate con otras concentraciones de Cd en el cacao y mayor cantidad (Tabla 6).

Tabla 6. Puntos experimentales de valor mínimo de % de bioaccesibilidad de Cd utilizando cacao de [Cd] conocida.

Cacao, g	Leche, g	Azúcar, g	[Cd] en cacao, mg/kg	Bioaccesibilidad de Cd, %		Error, %
				Valor experimental	Valor predicho	
7	0	2	1,23	7,22	7,07	2,08
70	0	20	5,43	9,21	8,94	2,96
70	0	20	9,11	11,65	10,57	9,24

Luego de haber obtenido la formulación para el valor mínimo, se procedió a tomar el valor experimental de la formulación de chocolate propuesta por el modelo ajustado, obteniéndose un error de 2,08%. También, se realizaron los puntos experimentales para las otras formulaciones de valor mínimo de % de bioaccesibilidad de Cd fijando el valor de [Cd] en cacao, con errores del 2,96 y 9,24%.

Estos resultados muestran que las formulaciones de chocolate, para cualquier concentración de Cd del cacao utilizado dentro del intervalo del modelo (Tabla 2), que poseen menor valor de % de bioaccesibilidad de Cd corresponden a chocolate

negro o amargo (*dark chocolate*); donde el alto contenido de grasa puede favorecer a la retención del Cd en la digestión gastrointestinal, y la ausencia de compuestos ácidos, como la leche, puede evitar la liberación del Cd en su forma bioaccesible.

5.5 EVALUACIÓN DEL MODELO

Se realizó la evaluación del modelo ajustado obtenido utilizando varias formulaciones diferentes a los puntos experimentales utilizados para el modelo. De los datos obtenidos, se calculó el error del valor predicho por el modelo para 10 formulaciones experimentales donde se obtuvieron errores de 8,84% en promedio (Tabla 7).

Tabla 7. Puntos experimentales de formulaciones de chocolate para la validación del modelo ajustado.

Cacao, g	Leche, g	Azúcar, g	[Cd] en cacao, mg/kg	Bioaccesibilidad de Cd, %		Error, %
				Valor experimental	Valor predicho	
3	0	3	9,11	23,27	22,97	1,31
3	2	2	6,63	28,51	25,80	9,51
3	2	4	9,11	27,33	24,26	11,23
5	0	2	6,63	16,47	15,57	5,45
5	0	4	6,63	18,73	16,66	11,09
5	4	4	9,11	24,54	22,39	8,77
70	0	30	6,63	11,64	10,55	9,31
70	20	40	6,63	16,87	15,03	10,86
70	40	30	6,63	22,02	19,99	9,22
3087	0	1023	8,41	15,22	13,45	11,64

El modelo se ajustó para las variables estipuladas en la elaboración de las formulaciones de chocolate; sin embargo, el modelo puede aplicarse para grandes

cantidades de cacao, leche y azúcar (A, B y C respectivamente) siempre y cuando se mantenga la proporción estipulados para este modelo (Tabla 2).

Esta afirmación se sustenta en resultados obtenidos (Tabla 7) para formulaciones de mayor masa; por ejemplo, para una formulación de 4 kilos, el valor experimental y predicho de bioaccesibilidad de Cd fueron 15,22 y 13,45%, respectivamente, diferencia que representa tan solo un 11,64% de error.

5.6 COMPARACIÓN CON OTROS VALORES

Los valores obtenidos de % de bioaccesibilidad de Cd para esta investigación se compararon con otros resultados de otros autores (Tabla 8). Si bien, las matrices utilizadas en los otros trabajos no son las mismas, utilizan como base cacao en los productos elaborados.

Tabla 8. Comparación del % de bioaccesibilidad de Cd con otros autores.

Valor	Bioaccesibilidad de Cd, %		
	Chocolate (Este trabajo)	Licor de cacao (Barraza <i>et al.</i> 2017)	Polvo bebida de chocolate (Peixoto <i>et al.</i> 2016)
Promedio	19,61 ± 5,25	99,2 ± 4,13	6,5 ± 3,04
Menor	7,22	91,0	3,0
Mayor	32,56	106,2	11,1

Una de las diferencias en el valor de % de bioaccesibilidad de Cd de este trabajo con el trabajo de Barraza y colaboradores es debido a que solo consideraron la digestión gástrica como procedimiento para determinar la fracción de Cd bioaccesible. Una de las razones de esta consideración se debe a que ellos mencionan que hay probabilidad de absorción de Cd antes de entrar a la fase pancreática, pero es una hipótesis aún por confirmar (Barraza *et al.*, 2017). También

modificaron las condiciones de la digestión para obtener altos % de bioaccesibilidad y maximizar los efectos en una posible intoxicación (Barraza *et al.*, 2017).

Los valores de bioaccesibilidad del trabajo de Peixoto y colaboradores son menores a los reportados ya que ellos utilizaron diferentes formulaciones de polvo de bebida, algunas de ellas con adiciones de compuestos funcionales que contribuyeron a una reducción del % de bioaccesibilidad de Cd. Además en ese trabajo también se optimizaron la cantidad de bilis y el pH en las digestiones gastrointestinales, incluyendo adiciones de compuestos dietarios como pectina y celulosa, que condujeron a menores valores de bioaccesibilidad de Cd (Peixoto *et al.*, 2016).

6 CONCLUSIONES

Se obtuvo un modelo matemático para correlacionar el % bioaccesibilidad de Cd con los componentes cacao, leche, azúcar y concentración de Cd total en el cacao; donde explicó el comportamiento de los datos experimentales con los datos predichos en un 94,01% y la evaluación del modelo mostró errores de 8.84% en promedio. En el modelo se encontró efecto significativo en todas las contribuciones lineales; observándose efectos negativos en la cantidad de cacao y azúcar, y efectos positivos en la cantidad de leche y la concentración de Cd en cacao. La contribución lineal de la cantidad de cacao y la cantidad de leche fueron las variables más significativas en el modelo.

Se propuso una formulación con la cantidad de cacao y azúcar correspondientes a un chocolate amargo, con un % bioaccesibilidad de Cd de 7,07%. Además, utilizando cacao de concentración de Cd dentro del intervalo del modelo, se propuso formulaciones que corresponde a chocolate amargo (*dark chocolate*) que poseen % de bioaccesibilidad de Cd predichos menores al 11 %.

7 RECOMENDACIONES

Este trabajo plantea como recomendación obtener un modelo para correlacionar la bioaccesibilidad de Cd con otros componentes de formulación de chocolate como componentes funcionales, endulzantes naturales y/o sintéticos, adición de frutos secos o rellenos, etc. También se puede implementar otras metodologías de digestión gastrointestinal, como métodos estáticos, con movimientos mecánicos, entre otros.

Por otro lado, se planea evaluar la bioaccesibilidad del Cd en chocolate en presencia de otras matrices de alimentos y cómo la presencia de estos alimentos pueda contribuir en tener menores valores de bioaccesibilidad de Cd.

Por último, se plantea determinar y evaluar la bioaccesibilidad de Cd para chocolate de mesa, producto característico en la canasta familiar santandereana, obteniendo un modelo para correlacionar con componentes de este producto.

BIBLIOGRAFÍA

ALEXANDER, J., BENFORD, D., COCKBURN, A., CRAVEDI, J.-P., DOGLIOTTI, E., DI DOMENICO, A., FÉRNANDEZ-CRUZ, M.L., FÜRST, P., FINK-GREMMELES, J., GALLI, C.L., & OTHERS, 2009. - Cadmium in food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 980: 1–139.

ALVES, R.N., MAULVAULT, A.L., BARBOSA, V.L., FERNANDEZ-TEJEDOR, M., TEDIOSI, A., KOTTERMAN, M., VAN DEN HEUVEL, F.H.M., ROBBENS, J., FERNANDES, J.O., ROMME RASMUSSEN, R., SLOTH, J.J., & MARQUES, A., 2018. - Oral bioaccessibility of toxic and essential elements in raw and cooked commercial seafood species available in European markets. *Food Chemistry*, 267: 15–27.

ARBOLEDA, R. & GONZÁLEZ, A., 2010. - ANÁLISIS SOCIECONÓMICO DEL SECTOR CACAOTERO COLOMBIANO (Tesis de pregrado), 1–113 p. Envigado, Colombia: Escuela de Ingeniería de Antioquia.

ARÉVALO-GARDINI, E., ARÉVALO-HERNÁNDEZ, C.O., BALIGAR, V.C., & HE, Z.L., 2017. - Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of The Total Environment*, 605–606: 792–800.

BARRAZA, F., SCHRECK, E., LÉVÊQUE, T., UZU, G., LÓPEZ, F., RUALES, J., PRUNIER, J., MARQUET, A., & MAURICE, L., 2017. - Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, 229: 950–963.

BHAT, Z.F., MORTON, J.D., MASON, S.L., BEKHIT, A.E.-D.A., & MUNGURE, T.E., 2019. - Pulsed electric field: Effect on in-vitro simulated gastrointestinal protein digestion of deer *Longissimus dorsi*. *Food Research International*, 120: 793–799.

CHANDRA, S., SINGH, D., & SARKAR, A., 2014. - PVC Membrane Selective Electrode for Determination of Cadmium(II) Ion in Chocolate Samples. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 22: 480–488.

CHAPARRO ACUÑA, S.P., VARGAS MORENO, P.A., SILVA GÓMEZ, L.A., & CÁRDENAS, O.E., 2017. - Cadmium voltametric quantification in table chocolate produced in Chiquinquirá-Boyacá, Colombia. *Acta Agronómica*, 66.

CHÁVEZ, E., HE, Z.L., STOFFELLA, P.J., MYLAVARAPU, R.S., LI, Y.C., MOYANO, B., & BALIGAR, V.C., 2015. - Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of The Total Environment*, 533: 205–214.

COBBETT, C. & GOLDSBROUGH, P., 2002. - PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 159–182.

ECHEVERRY, A. & REYES, H., 2016. - Determination of the concentration of cadmium in a Colombian chocolate with 65% of cocoa, and foreign chocolates with different cocoa percentages. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 10: 22–32.

EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM), 2011. - Statement on tolerable weekly intake for cadmium: Tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal*, 9: 1975.

FEDECACAO, 2018. - Economía Nacional. Producción de cacao. Colombia.

FRANCISCO, J., CARDOSO, C., BANDARRA, N., BRITO, P., HORTA, A., PEDROSA, R., GIL, M.M., DELGADO, I.M., CASTANHEIRA, I., & AFONSO, C., 2018. - Bioaccessibility of target essential elements and contaminants from *Fucus spiralis*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 74: 10–17.

GIACOMETTI, J., JOLIĆ, S.M., & JOSIĆ, D., 2015. - Cocoa Processing and Impact on Composition. *In: Processing and Impact on Active Components in Food*. pp. 605–612. Elsevier.

GRAMLICH, A., TANDY, S., ANDRES, C., CHINCHEROS PANIAGUA, J., ARMENGOT, L., SCHNEIDER, M., & SCHULIN, R., 2016. - Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of The Total Environment*.

GRAMLICH, A., TANDY, S., GAUGGEL, C., LÓPEZ, M., PERLA, D., GONZALEZ, V., & SCHULIN, R., 2018. - Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of The Total Environment*, 612: 370–378.

GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M., BERKTAŞ, I., & ÖZÇELİK, B., 2016. - Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. *LWT - Food Science and Technology*, 72: 559–565.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. & NAVARRO-BLASCO, I., 2012. - Estimation of dietary intake and content of lead and cadmium in infant cereals marketed in Spain. *Food Control*, 26: 6–14.

ICCO, 2019. - Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics Cocoa Year 2016/17. *QBCS*, XLIII: 1–147.

JENKINS, T.C. & MCGUIRE, M.A., 2006. - Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *Journal of Dairy Science*, 89: 1302–1310.

JIMÉNEZ TOBÓN, C.S., 2015. - Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. *Producción+ Limpia*, 10: 89–104.

LO DICO, G.M., GALVANO, F., DUGO, G., D'ASCENZI, C., MACALUSO, A., VELLA, A., GIANGROSSO, G., CAMMILLERI, G., & FERRANTELLI, V., 2018. -

Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food Chemistry*, 245: 1163–1168.

LOMBANA MIRANDA, R. & DÍAZ SÁNCHEZ, A., 2004. - Condiciones socioeconómicas del sector cacaotero en Santander: El caso de San Vicente de Chucurí (Tesis de pregrado) Tesis de pregrado, 126 p. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.

MARTÍNEZ, G. & PALACIO, C., 2010. - DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS CADMIO Y PLOMO EN SUELOS Y GRANOS DE CACAO FRESCOS Y FERMENTADOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA. (Tesis de pregrado) Tesis de pregrado, 1–98 p. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.

MARTINI, S., CONTE, A., & TAGLIAZUCCHI, D., 2018. - Bioaccessibility, bioactivity and cell metabolism of dark chocolate phenolic compounds after in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 49: 424–436.

MERTEN, J. & JOHNSON, B., 2018. - Massing a laser-induced plasma with atomic absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 149: 124–131.

MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALLANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., CARRIÈRE, F., BOUTROU, R., CORREDIG, M., DUPONT, D., DUFOUR, C., EGGER, L., GOLDING, M., KARAKAYA, S., KIRKHUS, B., LE FEUNTEUN, S., LESMES, U., MACIERZANKA, A., MACKIE, A., MARZE, S., MCCLEMENTS, D.J., MÉNARD, O., RECIO, I., SANTOS, C.N., SINGH, R.P., VEGARUD, G.E., WICKHAM, M.S.J., WEITSCHIES, W., & BRODKORB, A., 2014. - A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5: 1113–1124.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL, 2011. - Reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que debe cumplir el chocolate y productos de chocolate para consumo humano.

MOHAMMED, E., MOHAMMED, T., & MOHAMMED, A., 2018. - Optimization of instrument conditions for the analysis for mercury, arsenic, antimony and selenium by atomic absorption spectroscopy. *MethodsX*, 5: 824–833.

MOJICA-PIMIENTO, A. & PAREDES-VEGA, J.E., 2006. - Características del cultivo del cacao en Santander. Bogotá, Colombia: Banco de la República.

MOTAMAYOR, J.C., RISTERUCCI, A.M., LOPEZ, P.A., ORTIZ, C.F., MORENO, A., & LANAUD, C., 2002. - Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89: 380–386.

MOUNICOU, SZPUNAR, J., ANDREY, D., BLAKE, C., & LOBINSKI, R., 2003. - Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additives and Contaminants*, 20: 343–352.

MOUNICOU, SZPUNAR, J., LOBINSKI, R., ANDREY, D., & BLAKE, C.-J., 2002. - Bioavailability of cadmium and lead in cocoa: comparison of extraction procedures prior to size-exclusion fast-flow liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP-MS). *J. Anal. At. Spectrom.*, 17: 880–886.

PEIXOTO, R.R.A., DEVESA, V., VÉLEZ, D., CERVERA, M.L., & CADORE, S., 2016. - Study of the factors influencing the bioaccessibility of 10 elements from chocolate drink powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, 48: 41–47.

PEREA-VILLAMIL, J.A., CADENA-CALA, T., & HERRERA-ARDILA, J., 2009. - El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41: 128–134.

REDDY, S.A., REDDY, K.J., LAKSHMINARAYA, S., PRIYA, D.L., RAO, Y.S., & REDDY, A.V., 2008. - Extractive spectrophotometric determination of trace amounts of cadmium(II) in medicinal leaves and environmental samples using benzildithiosemicarbazone (BDTSC). *Journal of Hazardous Materials*, 152: 903–909.

RODRÍGUEZ-SERRANO, M., MARTÍNEZ-DE LA CASA, N., ROMERO-PUERTAS, M.C., DEL RÍO, L.A., & SANDALIO, L.M., 2008. - Toxicidad del cadmio en plantas. *Revista Ecosistemas*, 17.

SATARUG, S., VESEY, D.A., & GOBE, G.C., 2017. - Current health risk assessment practice for dietary cadmium: Data from different countries. *Food and Chemical Toxicology*, 106: 430–445.

SERRANO GÓMEZ, C., 2009. - Cacao Santander: comunicación de identidad regional del departamento de Santander a través de productos derivados del cacao Santandereano (Tesis de pregrado) Tesis de pregrado, 1–64 p. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.

SKOOG, D.A., HOLLER, J., & NIEMAN, T.A., 2001. - Principios de análisis instrumental (Quinta Edición. ed). 1070 p. Madrid, España: McGraw-Hill.

STOHS, S., 1995. - Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18: 321–336.

SWARTJES, F.A., VERSLUIJS, K.W., & OTTE, P.F., 2013. - A tiered approach for the human health risk assessment for consumption of vegetables from with cadmium-contaminated land in urban areas. *Environmental Research*, 126: 223–231.

TINKOV, A.A., FILIPPINI, T., AJSUVAKOVA, O.P., AASETH, J., GLUHCHEVA, Y.G., IVANOVA, J.M., BJØRKLUND, G., SKALNAYA, M.G., GATIATULINA, E.R., POPOVA, E.V., NEMERESHINA, O.N., VINCETI, M., & SKALNY, A.V., 2017. - The

role of cadmium in obesity and diabetes. *Science of The Total Environment*, 601–602: 741–755.

TORO-URIBE, S., LÓPEZ-GIRALDO, L.J., ALVAREZ-RIVERA, G., IBÁÑEZ, E., & HERRERO, M., 2019. - Insight of Stability of Procyanidins in Free and Liposomal Form under an in Vitro Digestion Model: Study of Bioaccessibility, Kinetic Release Profile, Degradation, and Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 67: 1990–2003.

TORRES-ESCRIBANO, S., DENIS, S., BLANQUET-DIOT, S., CALATAYUD, M., BARRIOS, L., VÉLEZ, D., ALRIC, M., & MONTORO, R., 2011. - Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus* sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). *Science of The Total Environment*, 409: 604–611.

VILLAMIZAR-JAIMES, A.R. & LÓPEZ-GIRALDO, L.J., 2017. - Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Respuestas*, 22: 75.

YANUS, R.L., SELA, H., BOROJOVICH, E.J.C., ZAKON, Y., SAPHIER, M., NIKOLSKI, A., GUTFLAIS, E., LORBER, A., & KARPAS, Z., 2014. - Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study. *Talanta*, 119: 1–4.

YU, G., ZHENG, W., WANG, W., DAI, F., ZHANG, Z., YUAN, Y., & WANG, Q., 2017. - Health risk assessment of Chinese consumers to Cadmium via dietary intake. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 44: 137–145.

ZHUANG, P., ZHANG, C., LI, Y., ZOU, B., MO, H., WU, K., WU, J., & LI, Z., 2016. - Assessment of influences of cooking on cadmium and arsenic bioaccessibility in rice, using an in vitro physiologically-based extraction test. *Food Chemistry*, 213: 206–214.

ZHURAVLEV, A., ZACHARIA, A., GUCER, S., CHEBOTAREV, A., ARABADJI, M., & DOBRYNIN, A., 2015. - Direct atomic absorption spectrometry determination of

arsenic, cadmium, copper, manganese, lead and zinc in vegetable oil and fat samples with graphite filter furnace atomizer. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38: 62–68.

ANEXOS

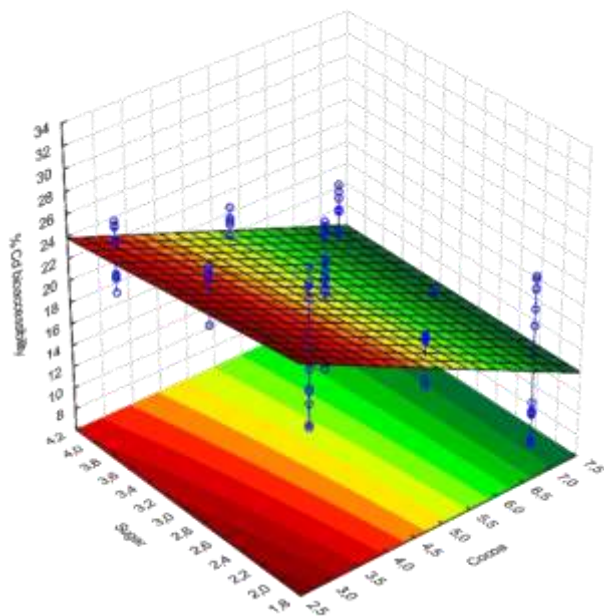
Anexo A. Tabla de resultados.

Experimento	[Cd] en cacao, mg/kg	Cacao, g	Leche, g	Azúcar, g	[Cd] total, mg/kg	[Cd] bioaccesible, mg/kg	Bioaccesibilidad de Cd, %
1	1,23	3,00	0,00	2,00	0,74	0,14	18,92
2	1,23	3,00	0,00	4,00	0,53	0,10	18,87
3	1,23	3,00	2,00	3,00	0,46	0,10	21,74
4	1,23	3,00	4,00	2,00	0,41	0,10	24,39
5	1,23	3,00	4,00	4,00	0,34	0,08	23,53
6	1,23	5,00	0,00	3,00	0,77	0,10	12,99
7	1,23	5,00	2,00	2,00	0,69	0,12	17,39
8	1,23	5,00	2,00	3,00	0,63	0,11	17,46
9	1,23	5,00	2,00	3,00	0,63	0,12	19,05
10	1,23	5,00	2,00	4,00	0,58	0,10	17,24
11	1,23	5,00	4,00	3,00	0,53	0,12	22,64
12	1,23	7,00	0,00	2,00	0,97	0,07	7,22
13	1,23	7,00	0,00	4,00	0,80	0,08	10,00
14	1,23	7,00	2,00	3,00	0,71	0,09	12,68
15	1,23	7,00	4,00	2,00	0,66	0,13	19,70
16	1,23	7,00	4,00	4,00	0,58	0,09	15,52
17	1,23	3,00	0,00	2,00	0,75	0,14	18,67
18	1,23	3,00	0,00	4,00	0,54	0,11	20,19
19	1,23	3,00	2,00	3,00	0,46	0,10	21,74
20	1,23	3,00	4,00	2,00	0,42	0,10	23,81
21	1,23	3,00	4,00	4,00	0,34	0,07	20,59
22	1,23	5,00	0,00	3,00	0,77	0,10	12,99
23	1,23	5,00	2,00	2,00	0,67	0,12	17,91
24	1,23	5,00	2,00	3,00	0,62	0,10	16,13
25	1,23	5,00	2,00	3,00	0,62	0,12	19,35
26	1,23	5,00	2,00	4,00	0,56	0,11	19,64
27	1,23	5,00	4,00	3,00	0,52	0,12	23,08
28	1,23	7,00	0,00	2,00	0,94	0,07	7,45

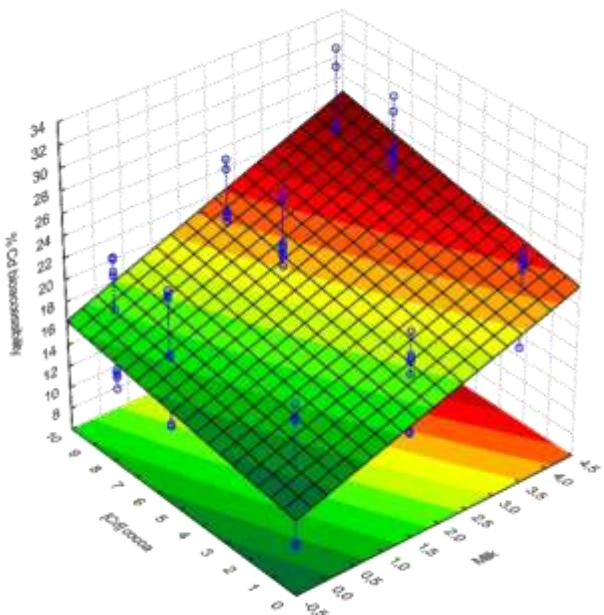
29	1,23	7,00	0,00	4,00	0,77	0,08	10,39
30	1,23	7,00	2,00	3,00	0,72	0,09	12,50
31	1,23	7,00	4,00	2,00	0,66	0,12	18,18
32	1,23	7,00	4,00	4,00	0,57	0,10	17,54
33	6,63	3,00	0,00	2,00	3,98	0,87	21,86
34	6,63	3,00	0,00	4,00	2,84	0,62	21,83
35	6,63	3,00	2,00	3,00	2,49	0,67	26,91
36	6,63	3,00	4,00	2,00	2,21	0,69	31,22
37	6,63	3,00	4,00	4,00	1,81	0,45	24,86
38	6,63	5,00	0,00	3,00	4,14	0,69	16,67
39	6,63	5,00	2,00	2,00	3,68	0,80	21,74
40	6,63	5,00	2,00	3,00	3,32	0,70	21,08
41	6,63	5,00	2,00	3,00	3,32	0,70	21,08
42	6,63	5,00	2,00	4,00	3,01	0,64	21,26
43	6,63	5,00	4,00	3,00	2,76	0,73	26,45
44	6,63	7,00	0,00	2,00	5,16	0,53	10,27
45	6,63	7,00	0,00	4,00	4,22	0,52	12,32
46	6,63	7,00	2,00	3,00	3,87	0,58	14,99
47	6,63	7,00	4,00	2,00	3,57	0,80	22,41
48	6,63	7,00	4,00	4,00	3,09	0,60	19,42
49	6,63	3,00	0,00	2,00	3,98	0,88	22,11
50	6,63	3,00	0,00	4,00	2,84	0,64	22,54
51	6,63	3,00	2,00	3,00	2,49	0,65	26,10
52	6,63	3,00	4,00	2,00	2,21	0,66	29,86
53	6,63	3,00	4,00	4,00	1,81	0,46	25,41
54	6,63	5,00	0,00	3,00	4,14	0,68	16,43
55	6,63	5,00	2,00	2,00	3,68	0,81	22,01
56	6,63	5,00	2,00	3,00	3,32	0,67	20,18
57	6,63	5,00	2,00	3,00	3,32	0,73	21,99
58	6,63	5,00	2,00	4,00	3,01	0,67	22,26
59	6,63	5,00	4,00	3,00	2,76	0,72	26,09
60	6,63	7,00	0,00	2,00	5,16	0,52	10,08
61	6,63	7,00	0,00	4,00	4,22	0,55	13,03
62	6,63	7,00	2,00	3,00	3,87	0,60	15,50
63	6,63	7,00	4,00	2,00	3,57	0,77	21,57
64	6,63	7,00	4,00	4,00	3,09	0,62	20,06
65	9,11	3,00	0,00	2,00	5,49	1,14	20,77
66	9,11	3,00	0,00	4,00	3,87	0,85	21,96
67	9,11	3,00	2,00	3,00	3,38	0,90	26,63
68	9,11	3,00	4,00	2,00	3,01	0,93	30,90

69	9,11	3,00	4,00	4,00	2,52	0,63	25,00
70	9,11	5,00	0,00	3,00	5,71	0,92	16,11
71	9,11	5,00	2,00	2,00	5,06	1,09	21,54
72	9,11	5,00	2,00	3,00	4,57	0,96	21,01
73	9,11	5,00	2,00	3,00	4,60	0,93	20,22
74	9,11	5,00	2,00	4,00	4,11	0,85	20,68
75	9,11	5,00	4,00	3,00	3,80	0,97	25,53
76	9,11	7,00	0,00	2,00	7,05	0,70	9,93
77	9,11	7,00	0,00	4,00	5,79	0,68	11,74
78	9,11	7,00	2,00	3,00	5,35	0,72	13,46
79	9,11	7,00	4,00	2,00	4,93	1,06	21,50
80	9,11	7,00	4,00	4,00	4,23	0,75	17,73
81	9,11	3,00	0,00	2,00	5,43	1,20	22,10
82	9,11	3,00	0,00	4,00	3,87	0,79	20,41
83	9,11	3,00	2,00	3,00	3,42	0,88	25,73
84	9,11	3,00	4,00	2,00	3,01	0,98	32,56
85	9,11	3,00	4,00	4,00	2,56	0,60	23,44
86	9,11	5,00	0,00	3,00	5,69	0,99	17,40
87	9,11	5,00	2,00	2,00	5,03	1,10	21,87
88	9,11	5,00	2,00	3,00	4,58	0,93	20,31
89	9,11	5,00	2,00	3,00	4,53	0,97	21,41
90	9,11	5,00	2,00	4,00	4,10	0,86	20,98
91	9,11	5,00	4,00	3,00	3,83	0,96	25,07
92	9,11	7,00	0,00	2,00	7,08	0,78	11,02
93	9,11	7,00	0,00	4,00	5,82	0,66	11,34
94	9,11	7,00	2,00	3,00	5,29	0,71	13,42
95	9,11	7,00	4,00	2,00	4,89	1,11	22,70
96	9,11	7,00	4,00	4,00	4,26	0,80	18,78

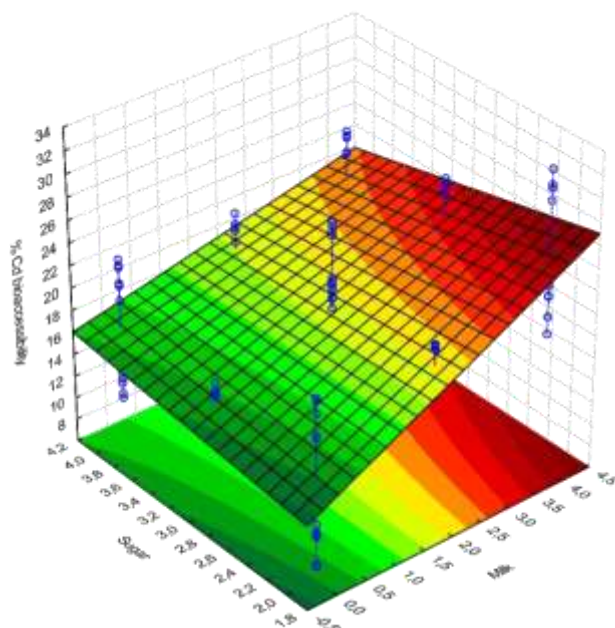
Anexo B. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de azúcar y cacao, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.



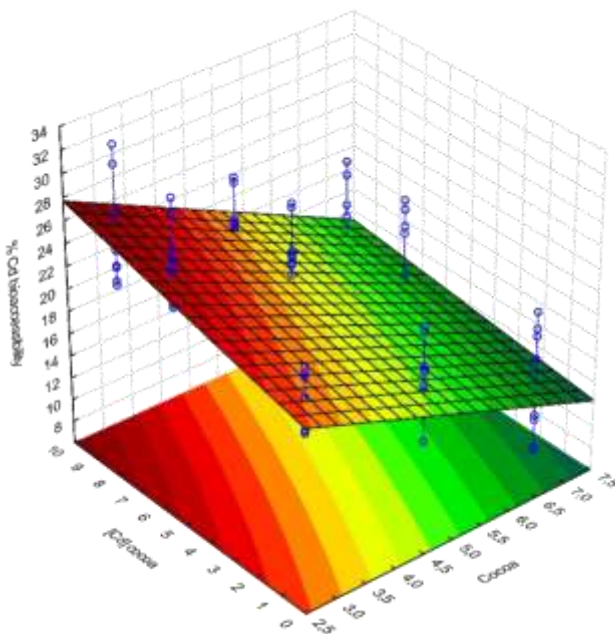
Anexo C. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de [Cd] en cacao y cantidad de leche, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.



Anexo D. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de azúcar y leche, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.



Anexo E. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de [Cd] en cacao y cantidad de cacao, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor



Anexo F. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % bioaccesibilidad de Cd en función de [Cd] en cacao y cantidad de azúcar, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.

