

Implementación de un método de análisis cualitativo y cuantitativo de Cadmio en cacao
utilizando las técnicas LIBS (Espectroscopía de plasma inducida por láser), F-AAS
(Espectroscopía de absorción atómica con llama) y métodos quimiométricos

Sandra Liliana Herrera Celis

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Química

Director

Rafael Cabanzo

Magister en Física

Codirector

Jáder Enrique Guerrero

Dr. Ciencias Naturales (Física)

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

Bucaramanga

2021

Dedicatoria

A mi Director el profesor Rafael Cabanzo sin su apoyo incondicional, sin sus ideas y acompañamiento siempre brillante, no habría sido posible lograr este paso en mi vida académica.

A mi mamá que me enseñó todo lo que una mujer realmente fuerte es capaz de hacer.

A Paola Ramírez, por siempre creer y apoyarme, a mis amigas incondicionales, Leidy Pineda, Ivonne Calderón, Katherine Acevedo, quienes me impulsaron y apoyaron en esta aventura.

Agradecimientos

Al profesor Rafael Cabanzo que me dio la oportunidad de retornar al mundo académico, por su apoyo incondicional, múltiples enseñanzas personales y profesionales, por creer en mí.

Al profesor Jáder Guerrero, por su apoyo, tiempo, dedicación y consejos siempre dispuesto del que aprendí mucho y aún queda mucho más por aprender.

A la Vicerrectoría de investigación y extensión UIS por su apoyo y gestión de recursos para la elaboración de este proyecto de investigación en el marco del proyecto 2812.

A mi familia, mi mamá, mi hermano, María Eugenia, mi nonita, quienes me apoyaron en esta etapa académica de mi vida.

A Pao por su apoyo incondicional y sincero siempre.

A mis compañeros de LEAM por su disponibilidad, colaboración, enseñanzas, compañía, a Ximena, Yuly, Kevin, Cindy, Genderson por los momentos compartidos.

Tabla de Contenido

Introducción	13
1. Planteamiento del problema.....	16
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo General	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. Justificación	19
4. Consideraciones Teóricas	21
4.1 El Cadmio	21
4.2 El Cacao	22
4.2.1 Contaminación de cacao con cadmio.....	23
4.3 Espectroscopía de absorción atómica en llama F-AAS	26
4.3.1 Interferencias	28
4.4 Espectroscopía de plasma inducida por láser LIBS	29
4.4.1 Caracterización del plasma	33
4.5 Quimiometría	35
4.5.1 Métodos multivariados para la construcción de modelos predictivos	36
4.5.2 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)	38
4.5.3 SIMPLS Algoritmo para PLS	40

4.5.4 Evaluación y Optimización de Modelos de Calibración (Estadística).....	41
5. Metodología	44
5. 1 Análisis cualitativo de muestras de cacao.....	45
5.1.1 Homogeneización de las muestras	45
5.1.2 Análisis espectral.....	49
5.2 Determinación de Cadmio por LIBS (Espectroscopía de plasma inducida por láser)	49
5.2.1 Determinación de Cadmio en pastillas de cacao	49
5.2.2 Transformación Sólido-líquido-sólido	50
5.3 Construcción de un modelo predictivo para determinación de concentración de Cadmio implementando LIBS, F-AAS y métodos quimiométricos	53
5.3.1 Determinación de cadmio por digestión asistida por microondas y posterior análisis por Absorción atómica	53
5.3.2 Análisis por Absorción atómica	55
5.3.3 Aplicación de métodos quimiométricos.....	57
6. Resultados y Análisis de resultados	59
6.1 Análisis cualitativo de cacao.....	59
6.2 Determinación de Cadmio por LIBS (Espectroscopía de plasma inducida por láser)	61
6.3 Caracterización del plasma	68
6.4 Análisis de muestras de cacao por absorción atómica	70
6.5 Construcción del modelo predictivo basado en PLS-1	71
7. Conclusiones	82
8. Recomendaciones	83

Referencias Bibliográficas84

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Los parámetros instrumentales del sistema LIBS para análisis cualitativo de cacao en pastilla.....	46
Tabla 2. Los parámetros instrumentales del sistema LIBS para análisis cualitativo de cacao en porta muestras de vidrio posterior transformación S-L-S	48
Tabla 3. Programación de la digestión asistida por microondas en el equipo	54
Tabla 4. Patrones para curva de calibración	55
Tabla 5. Condiciones de trabajo espectrómetro AAS	56
Tabla 6. Regiones de datos obtenida para la formación de la matriz X	58
Tabla 7. Elementos mayoritarios encontrados en las muestras de cacao mediante LIBS para dos tratamientos de muestra.....	60
Tabla 8. Resultado del estudio de parámetros de optimización de tratamiento SLST	64
Tabla 9. Parámetros espectroscópicos de las líneas de transición del Fe I utilizadas para el cálculo de la temperatura electrónica del plasma	69
Tabla 10. Descripción del rendimiento del modelo.....	78

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema de equipo de absorción atómica en llama	27
Figura 2. (a) Espectro de absorción parcial para el vapor de sodio. b) Transiciones electrónicas responsables de las líneas de absorción en (a).	27
Figura 3. (a) Diagrama esquemático de la formación y evolución del plasma (b) evolución temporal del plasma.....	30
Figura 4. Esquema de un sistema LIBS típico (1) Láser de pulso cortó, (2) sistemas ópticos de enfoque del haz láser sobre la muestra, (3) un espectrómetro y (4) sistema de cómputo procesador de las señales.	31
Figura 5. Representación gráfica de la ecuación (1).	37
Figura 6. Descomposición de la matriz X.....	39
Figura 7. Sistema LIBS para análisis de muestras de almendra de cacao.....	47
Figura 8. Procedimiento de transformación Sólido-Líquido-Sólido (S-L-S) para muestras de cacao.	51
Figura 9. Espectros totales en las líneas (a) 214,44 nm y (b) 226, 55 nm y área bajo la curva sombreada.....	58
Figura 10. Espectro de cacao en la ventana 214 nm (a) Pastilla de cacao sin transformación; (b) Pastilla de cacao post transformación (c) Porta muestras de vidrio, muestra SLST	64

Figura 11. Análisis del estudio de parámetros experimentales e instrumentales del proceso de transformación S-L-S (a) Volumen de solución añadido; (b) Tiempo de ultrasonido; (c) Numero de capas (d) Tiempo de retardo; (e) Distancia lente muestra; (f) Número de disparos.....	66
Figura 12. Diagrama de Boltzmann de las líneas de hierro neutro observadas en el espectro LIBS de una muestra de cacao con tratamiento SLS.....	70
Figura 13. Correlación de dos vectores b consecutivos contra el número de factores PLS.....	73
Figura 14. Error estándar de validación y error estándar de calibración.....	74
Figura 15. Errores estándar de 1000 particiones para cada uno de los primeros 12 LV utilizando el vector \bar{b} , en el plano SECV-SEC.....	75
Figura 16. Métricas de rendimiento del modelo para predecir la concentración de cadmio en muestras de cacao VS el número de variables latentes (Lv).....	76
Figura 17. Correlación entre los valores observados y los valores predichos (Valores de concentración de Cd).....	79
Figura 18. Residuales para la concentración de cadmio de predicción usando LIBS para las líneas de emisión 214.44 y 226.5 nm.....	80
Figura 19. Histograma de los residuales para la predicción dela concentración de cadmio en cacao.....	81
Figura 20. Comparación espectros LIBS muestras M07 y M08.....	82

Lista de Anexos

	pág.
Anexo 1. Análisis elemental de pastillas y portamuestras de vidrio de cacao	89
Anexo 2. Concentraciones determinadas por medio de Absorción atómica con llama F-AAS..	93

Glosario

Codex Alimentarius: Es un conjunto de normas alimentarias adoptadas internacionalmente y presentadas de manera uniforme. Los objetivos de la publicación de estas normas consisten en proteger la salud del consumidor y facilitar el comercio internacional de alimentos.

F-AAS: Espectroscopía de Absorción atómica con llama.

Homocedasticidad: Es una característica de un modelo de regresión lineal que implica que la varianza de los errores es constante a lo largo del tiempo.

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

LIBS: Espectroscopía de plasma inducida por láser, un tipo de Espectroscopía de emisión.

LOC: Límite de cuantificación, la mínima concentración que puede ser determinada cuantitativamente por una metodología.

LOD: Mínima concentración que una metodología instrumental o equipo es capaz de detectar.

LTE: Equilibrio Termodinámico Local

MCCV: Método de validación cruzada de Monte Carlo, un método para la partición de un grupo de muestras en grupo de calibración y grupo de validación.

Ortogonalidad: Dos vectores ortogonales en el plano son dos vectores que forman un ángulo de 90 grados y su producto escalar es cero

Plasma: Es un estado parecido al gas, pero compuesto por átomos ionizados, donde los electrones circulan libremente. Calentando un gas se puede obtener plasma.

Validación cruzada: Es una técnica para evaluar modelos de calibración mediante el entrenamiento de varios modelos, en subconjuntos de los datos de entrada disponibles y evaluarlos con el subconjunto complementario de los datos.

Resumen

Título: Implementación de un método de análisis cualitativo y cuantitativo de Cadmio en cacao utilizando las técnicas LIBS (Espectroscopía de plasma inducida por láser), F-AAS (Espectroscopía de absorción atómica en llama – Espectroscopía de emisión atómica) y métodos quimiométricos*

Autor: Sandra Liliana Herrera Celis

Palabras Clave: Cacao, Cadmio, LIBS, AAS, Quimiometría, Validación cruzada

Descripción:

La contaminación con Cadmio se ha convertido en un problema de interés internacional debido a su alta toxicidad. Es nefrotóxico, genera daño en la función tubular y glomerular, causa osteomalacia generalizada, así como osteoporosis, y es considerado como agente cancerígeno por la IARC (*International Agency for Research of Cancer*), éste, ingresa al organismo humano a través del consumo de alimentos contaminados entre ellos, el cacao y sus derivados. El *Codex Alimentarius*, en enero de 2019, estableció los rangos máximos de contenido de cadmio en chocolate en función de la concentración de cacao en el reglamento (UE) No 488/2014.

Este proyecto de investigación desarrolló un modelo predictivo para determinar la concentración de cadmio en cacao basado en las técnicas LIBS (Espectroscopía de plasma inducida por láser), y F-AAS (Absorción atómica en llama) combinados con la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-R). Se aprovecha la relativa facilidad para generar los datos espectrales de LIBS, la exactitud de F-AAS como técnica analítica y los métodos quimiométricos para generar un método de referencia. El modelo de calibración se desarrolló con 46 muestras de cacao, cuyas concentraciones se encuentran en el rango de 0 a 1 ppm; el modelo produjo valores de SECV superiores al SEC por lo que se considera un modelo adecuadamente ajustado, además, obtuvo un valor RER de 8.98 por lo que se clasificó como un modelo de tamizaje. Adicionalmente se llevó a cabo el análisis cualitativo del cacao encontrando elementos mayoritarios como Ca, P, K, Mg, Mn y Fe. El proyecto se enmarca en el interés de Colombia de potenciar su exportación, mejorando los productos derivados del cacao, el cual presenta notables cualidades, como su fino sabor y aroma; al mismo tiempo en fortalecer la oferta que actualmente cubre el 5% de la demanda mundial.

* Tesis de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rafael Cabanzo, MSc. Física. Co-director: Jáder Enrique Guerrero, Dr. Ciencias naturales (Física)

Abstract

Title: Implementation of a method for qualitative and quantitative analysis of Cadmium in cocoa using LIBS (Laser Induced breakdown Spectroscopy), F-AAS (Flame Atomic Absorption Spectroscopy - Atomic Emission Spectroscopy) and chemometric methods*.

Author(s): Sandra Liliana Herrera Celis **

Key Words: Cocoa, Cadmium, LIBS, AAS, Chemometrics, Cross Validation

Description:

Cadmium contamination has become a problem of international interest due to its high toxicity. It is nephrotoxic, causes damage to tubular and glomerular function, causes generalized osteomalacia, as well as osteoporosis, and is considered a carcinogen by the IARC (International Agency for Research of Cancer), it enters the human body through the consumption of contaminated foods, including cocoa and its derivatives. The Codex Alimentarius, in January 2019, established the maximum ranges of cadmium content in chocolate based on the concentration of cocoa in the regulation (EU) No 488/2014.

This research project developed a predictive model to determine cadmium concentration in cocoa based on LIBS (Laser Induced Plasma Spectroscopy), and F-AAS (Flame Atomic Absorption) techniques combined with Partial Least Squares Regression (PLS-R). The relative ease of generating LIBS spectral data and the accuracy of F-AAS are exploited to generate a reference method. The calibration model was developed with 46 cocoa samples, whose concentrations are in the range of 0 to 1 ppm; the model produced SECV values higher than the SEC so it is considered an adequately adjusted model, in addition, it obtained a RER value of 8.98 so it was classified as a screening model. In addition, a qualitative analysis of the cocoa was carried out, finding major elements such as Ca, P, K, Mg, Mn and Fe. The project is part of Colombia's interest in boosting its exports by improving cocoa products, which have notable qualities, such as their fine flavor and aroma, while at the same time strengthening the supply that currently covers 5% of world demand.

* Bachelor Thesis

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: Rafael Cabanzo, MSc. Physics. Co-director: Jader Enrique Guerrero, Dr. Natural Sciences (Physics)

Introducción

La contaminación por metales pesados en alimentos se ha convertido en los últimos años en uno de los tópicos de mayor interés a nivel mundial. Elementos tóxicos como el cadmio (Cd) y Plomo (Pb) son introducidos en los alimentos a través del suelo, el agua, el aire, los procesos de transporte entre otros, como producto derivado de procesos industriales y agrícolas (Santos et al., 2009; Yang et al., 2019). El cadmio, tiene un alto potencial de acumulación (tiempos de vida media de 10 a 30 años), es nefrotóxico, causa daño tubular en el riñón, y osteomalacia generalizada, así como osteoporosis. La primera vez que se documentó la intoxicación masiva con Cadmio ocurrió en la región del *Jinzū*, en 1960, dónde se originó la enfermedad de *ita-itai* (conocida así por la expresión japonesa para el dolor), que generaba un alto daño renal y osteomalacia, causada por el consumo de arroz contaminado con Cadmio, introducido por el riego con agua contaminada generada por las empresas mineras ubicadas en las montañas (Järup & Åkesson, 2009) , además, el cadmio es considerado agente cancerígeno humano (grupo I) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), (IARC Summary & Evaluation, Volume 58, 1993). El cadmio ingresa al cuerpo humano en mayor proporción a través de la ingesta de alimentos contaminados, es por ello, que la unión europea ha liderado un arduo trabajo en su control y monitoreo, a través del *Codex Alimentarius*. Algunos alimentos contribuyen en mayor grado a la exposición al cadmio debido a su elevada concentración en los mismos, por ejemplo, las algas marinas, los peces, mariscos y productos de chocolate. Para el caso del cacao y sus derivados, la reglamentación más reciente y vigente corresponde al reglamento (UE) No 488/2014 que estableció los rangos

máximos de contenido de cadmio en chocolate en función de la concentración de cacao y que empezó a regir a partir del 1 de enero de 2019 (UE,2014).

Colombia es reconocida a nivel mundial por la calidad de su cacao que es considerado cacao fino de sabor y aroma, cuyo consumo representa el 5% de la producción mundial, y que se considera, entrará en escasez en el año 2020 (Procolombia, 2021). La industria del chocolate es una de las agroindustrias con más tradición y auge en el país, por ello es necesario establecer metodologías para la determinación de los niveles de este contaminante en los productos de origen nacional en concordancia con la normatividad internacional (*INVIMA,2014;UE,2014*). La creciente importancia de las mediciones químicas en el campo de los alimentos permite el desarrollo y la validación de métodos para mejorar la calidad de los resultados analíticos con el fin de garantizar su calidad. Estos resultados son importantes tanto para los fabricantes, como para los consumidores. Técnicas como ICP-AES, F-AAS, GF-AAS e ICP-MS (*CODEX ALIMENTARIUS, 2015*), se han convertido en la opción más común para el análisis multielemental gracias a su alta sensibilidad. Por otro lado, LIBS se ha posicionado como una opción que disminuye costos y tiempos de análisis debido a que reduce los procesos de preparación de la muestra, y si se combina con los métodos quimiométricos, permite elaborar modelos predictivos para cuantificar elementos en diferentes muestras, en especial, en alimentos. Este proyecto llevó a cabo la implementación de la técnica F-AAS para cuantificar la concentración de cadmio en cacao, combinando estos resultados con la agilidad de LIBS para identificar elementos en muestras y los métodos quimiométricos para generar un modelo predictivos basado en PLS-1, logrando la reducción de los tiempos y costos en el procesamiento de las muestras y trabajo analítico (Mrmošanin *et al.*, 2018), que permita sustituir otras técnicas de análisis usuales como: Espectroscopía de absorción

atómica (AAS), Espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF), Análisis de activación de neutrón instrumental (INAA) y Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente/Espectrometría de masas (ICP-OES/MS) (Markiewicz-Keszycka et al., 2017; Martínez, 2010).

1. Planteamiento del problema

En el año 2018 el cacao Colombiano obtuvo el premio en la categoría de cacao de excelencia en los *International Cocoa Awards* (Markiewicz-Keszycka et al., 2017). En el mes de abril de 2019 en Abidjan, Costa de Marfil, se ratificó a Colombia como país exportador de cacao fino de aroma, lo que le otorga una condición privilegiada para la competitividad del grano colombiano, que tiene alta oportunidad de exportación a mercados como el europeo, en donde buscan un grano de calidad, y en el asiático, donde procesan el cacao y su consumo es creciente. Entre enero y junio del 2021 las exportaciones de cacao y sus derivados sumaron US\$57,1 millones, 11,2% más que durante el mismo periodo del año anterior (Procolombia, 2021), El año cacaotero que acaba de finalizar, que inició en octubre de 2020 y terminó en septiembre de 2021, mostró el comportamiento en producción más alto de la historia productiva del cacao en Colombia, con 70.205 toneladas de grano seco (Fedecacao, 2021), lo que fortalece el gran potencial comercial para este sector, sin embargo, para poder aprovechar esta coyuntura, es necesario establecer metodologías analíticas que permitan verificar el cumplimiento de legislaciones internacionales para las importaciones como el reglamento europeo (UE) No 488/2014 que rige el contenido máximo de cadmio en grano de cacao y sus derivados a partir del 1 de Enero de 2019 (*Codex Alimentarius, 2014*). Es por ello que se planteó como objetivo de esta investigación, la implementación de una metodología basada en Espectroscopía de absorción atómica de llama (F-AAS) para realizar la cuantificación de cadmio en cacao combinada con los datos espectrales obtenidos por LIBS (Espectroscopía de plasma inducida por láser) y métodos quimiométricos,

específicamente regresión por mínimos cuadrados parciales PLS-1, junto con el método de validación cruzada, para determinar el número adecuado de variables latentes, y de esta manera generar un modelo predictivo que permita la determinación de cadmio en cacao, ofreciendo ventajas como la disminución en tiempos de análisis y costos, e incluso la posibilidad de establecer metodologías portátiles para la medición en campo de cadmio en cacao gracias a la portabilidad de LIBS (Markiewicz-Keszycka et al., 2017).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Construir un modelo predictivo que permita la determinación cuantitativa de cadmio en muestras de cacao en forma rápida y eficiente mediante la implementación de las técnicas F-AAS (Espectroscopía de absorción atómica en llama) y LIBS (Espectroscopía de Plasma generado por láser).

2.2 Objetivos Específicos

Implementar la técnica F-AAS para la detección y cuantificación de cadmio en muestras de cacao colombiano y determinar los parámetros óptimos para dicha medición.

Implementar la técnica LIBS para la detección de cadmio en muestras de cacao colombiano y determinar los parámetros óptimos de tratamiento de la muestra e instrumentales para dicha medición.

Realizar un análisis cualitativo de cacao mediante LIBS.

Construir un modelo predictivo para determinar Cadmio en cacao a partir de la aplicación de un modelo quimiométrico de (PLS-1) de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) con los espectros obtenidos con LIBS y las concentraciones obtenidas con F-AAS.

Determinar los parámetros estadísticos que permitan validar el modelo predictivo de concentración de cadmio y su rendimiento.

3. Justificación

Colombia es el décimo productor de cacao en el mundo según la ICCO. La industria cacaotera ha venido creciendo tanto en áreas sembradas como en la productividad por hectárea, el potencial de exportación del cacao y sus derivados procesados es muy alto. En el 2020, Colombia exportó granos de cacao y derivados como el chocolate a más de 70 países incluidos los de la región MEASA (Medio Oriente, África y Sur de Asia). Las exportaciones de cacao y sus derivados desde Colombia hacia esa región, superaron el US\$1 millón, con un incremento de 97,8%, al tener a Sudáfrica, Mozambique, India y Emiratos Árabes Unidos como los principales compradores (*Fedecacao, 2021*); dicho cacao, es catalogado como de fino sabor y aroma (*Procolombia, 2017*), pero para poder ingresar a estos mercados internacionales, tanto el cacao como sus derivados, deben cumplir con los estándares internacionales de calidad de inocuidad, entre ellos el reglamento europeo UE No 488/2014 del *Codex Alimentarius*, que establece los límites de concentración de cadmio para productos derivados del cacao, pero el problema de la contaminación de cacao con cadmio no es un problema meramente económico, más allá de esto, se convierte en un problema para la salud pública, nacional e internacional teniendo en cuenta que el consumo de cacao y sus derivados en Europa, que es uno de los mercados más amplios para la exportación de este producto, supera ampliamente el consumo Latinoamericano (*European Food Safety Authority, 2012*).

Actualmente, la metodología establecida para la determinación de cadmio en cacao se basa en técnicas como: Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS), Espectrometría de fluorescencia de

rayos X (XRF), Análisis de activación de neutrón instrumental (INAA) y Espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente / Espectrometría de masas (ICP-OES/MS) que se caracterizan por su alta precisión y reproducibilidad; pero que requieren procesos que consumen tiempo (por la preparación de la muestra) e insumos y reactivos (algunos contaminantes o de alto costo), por ello, desde la perspectiva del sector cacaotero, se puede dificultar el control de este elemento. En ese sentido este proyecto trata con la elaboración de un modelo predictivo para la concentración del Cadmio, en la almendra de cacao, a partir de espectros LIBS. El modelo de calibración se fundamenta en la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-1), adopta como método de referencia la espectroscopía F-AAS y utiliza la validación cruzada Monte Carlo para estimar su desempeño. LIBS en combinación con técnicas quimiométricas ofrece una alternativa para la determinación de concentraciones de manera ágil y con relativamente poco tratamiento de la muestra. De esta manera alivia costos, manteniendo niveles de exactitud y precisión razonables, dentro de la normatividad internacional (*Codex Alimentarius, 2014*).

4. Consideraciones Teóricas

4.1 El Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal de transición sin funciones biológicas esenciales, por el contrario, es tóxico para plantas, animales y humanos en bajas concentraciones. El Cd se libera naturalmente en los suelos a través de la meteorización de las rocas, que típicamente contienen Cd en concentraciones de 0.2 mg/Kg, pero las actividades antropogénicas como la minería, la fundición, la industria microelectrónica y los fertilizantes de roca han aumentado significativamente el contenido de Cd en muchos suelos del mundo (Bravo, Leon-Moreno, et al., 2021; Gramlich et al., 2017), y esta característica se agrava debido a que este elemento comparado con otros metales pesados como el plomo, tiene una alta movilidad en los suelos y es rápidamente absorbido por las plantas (Bravo, Leon-Moreno, et al., 2021) . La exposición prolongada a altas dosis de cadmio causa la enfermedad *Itai-itai* la cual afecta principalmente a las mujeres y se caracteriza por daño progresivo en la función tubular y glomerular y osteomalacia generalizada y osteoporosis que dan lugar a múltiples fracturas, daños asociados a concentraciones de 600 µg/día, identificados en los habitantes de la región de *Jinzu* (Kobayashi et al., 2009). La exposición prolongada a bajas concentraciones de cadmio se ha relacionado además, con una pérdida de la capacidad de reabsorción de nutrientes, vitaminas y minerales, estas pérdidas incluyen zinc y cobre unidos a la metalotioneína (MT) de la proteína de unión a metales, glucosa, aminoácidos, fosfato, calcio, β₂-MG y proteína de unión a retinol (RBP) (Satarug et al., 2017); El cadmio, aumenta el riesgo de sufrir pre-diabetes y diabetes, como también, tiene relación con la generación de

hipertensión arterial y afecciones pulmonares entre otros, basándose en sus efectos cancerígenos y, más concretamente, en los efectos adversos observados en el cerebro, los riñones y los huesos, la Unión Europea clasificó el Cd y sus derivados clorados, oxigenados, sulfurados y sulfatados, en la categoría 1B.

Del mismo modo, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) clasificaron el Cd en el grupo 1 y en la clase B, respectivamente (Barraza et al., 2017; Schwartz et al., 2003) .

4.2 El Cacao

El árbol de cacao o cacaotero, cuyo nombre científico, *Theobroma cacao L*, es una planta de hoja perenne de la familia *Malvaceae*, se cultiva en terrenos con precipitaciones de 1600 a 2500 mm, temperaturas alrededor de 25°C, en suelos aluviales, francos y profundos con subsuelo permeable y rangos de pH óptimo en el rango de 6.0 a 6.5 (Martínez, 2010). Es un cultivo no perecedero originario de la Amazonía, con un alto valor comercial, que se ha convertido en un impulso para las economías de países en vía de desarrollo. Según datos de la Organización Internacional de Cacao (ICCO), las zonas de cultivo del cacao son, África Occidental que concentra el 72% de la producción, el Sudeste de Asia y América Latina. El cacao que se produce en el país es reconocido como de gran calidad con escaso contenido en taninos, el cual se reserva para la fabricación de los chocolates más finos. Su sabor en bruto es muy amargo y astringente (Invima, 2017) , es considerado como un alimento beneficioso por su alto contenido de vitaminas y antioxidantes (Satarug et al., 2017), por lo que es considerado de alto consumo, por lo tanto, tiene un gran potencial comercial para Colombia, ya que el país cuenta con condiciones agroecológicas óptimas y excelentes materiales genéticos para la producción de esta variedad,

categoría que alberga sólo el 5% del grano mundialmente comercializado (*International Cocoa Organization, ICCO*) y que es de uso exclusivo para la elaboración de chocolates finos por su acidez y equilibrio. Por dichas cualidades es un producto con un alto potencial de exportación. Para 2021, señala ProColombia, se exportaron US\$57,1 millones a 70 países. En este mismo año, el país alcanzó la máxima producción en toda su historia, la cual fue de 70.205 toneladas de grano lo que significa un incremento del 9,2% respecto al año inmediatamente anterior (Procolombia, 2021; Portafolio, 2021), además, el sector cacaotero ha venido creciendo de forma ordenada y organizada, en renovación de plantaciones, el país tiene más o menos unas 80.000 hectáreas envejecidas de cacao y planea renovar cerca de 10.000 en el 2021 con el objetivo de poner a producir 70.000 hectáreas envejecidas de cacao en el mediano plazo (Minagricultura, 2021). El departamento con mayor área sembrada según el portal de datos abiertos, es Nariño con un área sembrada de 18600 hectáreas, equivalentes a 2800 toneladas, con un rendimiento de 0,2 (ton/Ha), seguido por el departamento de Santander que reporta 17019 hectáreas en el municipio de San Vicente de Chucuri que produjo 6540 toneladas, es decir un rendimiento del 0,5 (ton/Ha) (Datos Abiertos Colombia, 2018). Esto significa que Colombia y en especial el departamento de Santander, tiene un gran potencial de exportación.

4.2.1 Contaminación de cacao con cadmio

La absorción de cadmio por parte de las plantas de cacao, se ha convertido en un tema de alto interés para la salud pública, luego de que se encontraran altos contenidos de Pb y Cd en productos derivados del cacao, ya que la mayor fuente de Cd corresponde a la dieta (Kobayashi et al., 2009; Satarug et al., 2017), muchos productos de chocolate contienen hasta 100 µg/Kg de Cd, más altos que otros productos alimenticios según la Autoridad Europea de Seguridad

Alimentaria, *European Food Safety Authority* (EFSA, 2012) para 2012, se consideraba que los productos de confitería de chocolate contribuyeron en promedio 4,3% a la ingesta semanal de Cd de la población europea. Los productos de cacao de América Latina generalmente contienen concentraciones de Cd más altas que los de África Occidental, sin embargo, se ha encontrado que existe una variación considerable en el contenido de Cd en el grano de cacao en América Latina, tanto entre países como dentro de los países, y estas diferencias se atribuyen a la variación en la composición y propiedades del suelo, ya que se ha encontrado una mayor concentración en suelos sedimentados aluviales o ricos en andesita y otras rocas volcánicas (Zarcinas *et al.*, 2004), pero también, al uso de fertilizantes con contenidos de Cadmio y fósforo, ya que los bloques de fósforo utilizados en la producción de fertilizantes son las principales fuentes de contaminación de Cd en los suelos agrícolas (Castro *et al.*, 2015; Vanderschueren *et al.*, 2020), adicionalmente se considera que la movilidad del Cd en los suelos es alta en comparación con otros metales pesados, y es absorbido fácilmente por las plantas, aunque no tenga funciones biológicas esenciales (McLaughlin y Singh, 1999), por ello la preocupación respecto a otras fuentes antropogénicas además de los fertilizantes, como la minería, la fundición, la industria del plástico y la microelectrónica, llegadas con la nueva era tecnológica (Gramlich *et al.*, 2017) .

La Dirección General de Sanidad y Consumo de la Unión Europea (DG SANCO), solicitó modificación al Reglamento UE No. 1881 de 2006 fijando niveles de cadmio para productos de cacao establecido en 7 µg/kg. En enero de 2012, Ecuador manifiesta ante el Comité Coordinador del *Codex Alimentarius* para América Latina y el Caribe (CCLAC) su preocupación ante el establecimiento de un nivel máximo de cadmio en cacao y sus productos e impacto a los países productores de la región, en Marzo de 2012 (Organización mundial del comercio, 2021). En el

Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), incluye el tema en la lista de prioridades de los aditivos y contaminantes alimentarios y compromiso de envío de datos de niveles de Cd en cacao y sus productos para realizar la evaluación de exposición por países productores e interesados. El 20 de noviembre de 2012 se llevó a cabo la reunión del comité coordinador del Codex para Latinoamérica y el caribe CCLAC (Costa rica), y se creó el grupo de trabajo que vincula a 20 países productores de cacao y sus derivados liderado por Ecuador y apoyado por Colombia, para generar una propuesta que involucre la región (Invima, 2017). A partir del 1 de enero del 2019 comenzó a regir el Reglamento UE de la Comisión No. 488/ 2014 que modifica el Reglamento CE No. 1881/2006 el cual regular el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios con el fin de proteger la salud pública; de acuerdo a este reglamento la máxima concentración de cadmio en cacao y derivados del cacao es:

- Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao menor a 30% será de 0,10mg/kg
- Chocolate con contenido de materia seca total de menos de 50% el límite máximo será de 0,30 mg/kg
- Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao mayor o igual a 50% tendrá un límite máximo de 0,80 mg/kg
- Cacao en polvo vendido al consumidor final 0,60 mg/kg (*Codex Alimentarius, 2014*).

El *Codex Alimentarius* en su norma: CODEX STAN 234-1999 Métodos Recomendados de Análisis y de Muestreo Recomendados; revisada y actualizada en el año 2011, recomienda entre otros los métodos de ICP–OES (Espectroscopía de emisión óptica con fuente de plasma de

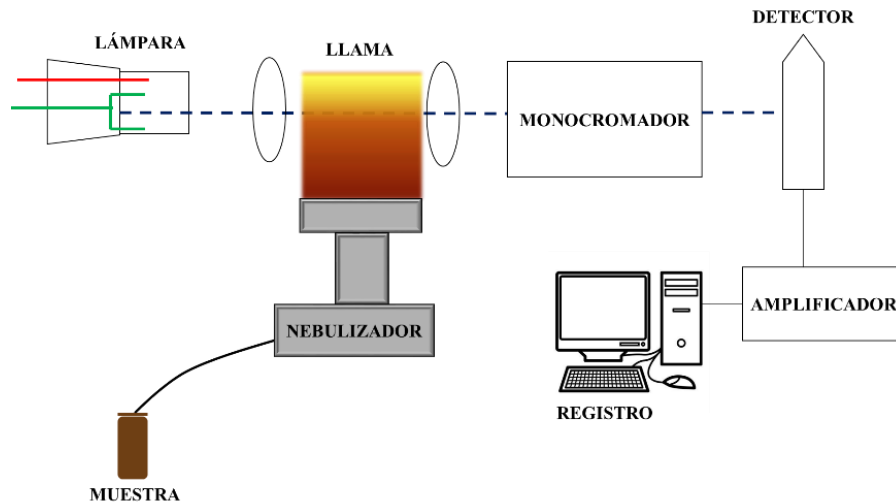
acoplamiento inductivo, ICP- MS (Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo), GF- AAS (Espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito (*Codex Alimentarius, 2017*)).

4.3 Espectroscopía de absorción atómica en llama F-AAS

Los métodos de Espectroscopía atómica son utilizados para la determinación cualitativa y cuantitativa de más de 70 elementos. Normalmente estos métodos pueden detectar cantidades entre partes por millón y partes por billón en algunos casos. La determinación espectroscópica de especies atómicas sólo puede realizarse en un medio gaseoso en el cual los átomos individuales o iones elementales, se encuentran bien separados uno de otro. Por lo tanto, el primer paso de todos los procedimientos de Espectroscopía atómica es la atomización, un proceso en el cual una muestra es volatilizada y descompuesta de tal forma que se producen átomos e iones en fase gaseosa. La Espectroscopía atómica en llama tiene temperaturas típicas de ionización de 1700 – 3150°C, es un tipo de Espectroscopía de absorción en la que una fuente externa de radiación incide sobre el analito en forma de vapor, como lo ilustra la figura 1. Si la fuente de radiación es de la frecuencia (longitud de onda) adecuada, puede ser absorbida por los átomos del analito y promoverlos hacia los estados excitados. La figura 2 muestra tres de las líneas de absorción del vapor de sodio (Skoog et al., 2015, p. 775). La fuente de estas líneas espectrales está indicada en el diagrama de la figura 2 (b).

Figura 1.

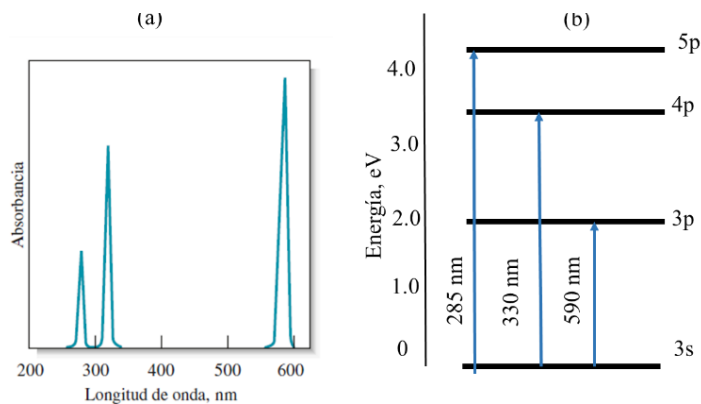
Esquema de equipo de absorción atómica en llama



Nota. Fuente el autor basado en los conceptos de Skoog, 2015.

Figura 2.

(a) Espectro de absorción parcial para el vapor de sodio. b) Transiciones electrónicas responsables de las líneas de absorción en (a).



La relación entre la intensidad de la radiación electromagnética de una longitud de onda dada transmitida a través de un vapor atómico y la concentración de átomos capaces de absorber,

está dada por la ley de Beer. Esta ley es de fundamental importancia cuando se consideran aspectos cuantitativos en los procesos de absorción atómica, de acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia A , es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes, c , y a la longitud de la trayectoria, b , del medio absorbente, como se expresa : $A = a . b . c$

Dónde a corresponde a la constante de proporcionalidad denominada coeficiente de absorción molar. De esta manera la Ley de Beer establece una relación lineal entre la concentración y la absorbancia que comúnmente es graficada como Absorbancia vs. Concentración (Gonzalez, 2005; Skoog et al., 2015, p. 775).

4.3.1 Interferencias

Las posibles interferencias que se pueden presentar en la espectroscopia de absorción atómica se consideran clasificadas en tres tipos:

4.3.1.1 Interferencias Químicas. Resultan generalmente de la disociación incompleta de los compuestos de los elementos por determinar, en este caso los resultados analíticos pueden depender de otros elementos y radicales presentes en la solución, la mayoría de estas interferencias se remueven utilizando una llama de mayor temperatura, Petrova *et al*, encontró que se pueden identificar impurezas de Sn, Pb y Cu en análisis de Cadmio para muestras de cadmio analítico las cuales se pueden eliminar mediante el control de temperatura y tiempo de análisis (Petrova et al., 2016).

4.3.1.2 Interferencias de ionización. Se producen cuando una gran parte de los átomos de la muestra se ionizan y absorben en una línea diferente de radiación que no pasa por el monocromador o que es emitida por la lámpara.

4.3.1.3 Interferencias de matriz. Corresponden a los cambios en el resultado analítico producido por la naturaleza de la solución muestra, una concentración dada de un elemento en un solvente orgánico, podría absorber de dos a cuatro veces más que un solvente acuoso. Otro efecto matriz es el que presentan los sólidos disueltos en solución (Gonzalez, 2005, p. 11). A medida que la solución se concentra, fluye más lentamente por el quemador y se disminuye la absorción, por ello se utilizan métodos de dilución adicional (*AOAC OFFICIAL METHOD, 1999*).

Los análisis cuantitativos a menudo se basan en calibraciones estándar externas. En la absorción atómica, las desviaciones de la linealidad ocurren con más frecuencia que en la absorción molecular. Por lo tanto, los análisis no deben basarse nunca en la medición de un solo estándar bajo el supuesto de que se cumple la ley de Beer. Además, la producción de un vapor atómico involucra muchas variables incontrolables, de tal forma que la absorbancia de al menos una disolución estándar debe ser medida en cada ocasión que se realiza un análisis. Frecuentemente se utilizan dos estándares cuyas absorbancias se encuentran por debajo y por encima (soporte) de la absorbancia de la muestra. Cualquier desviación del estándar de su valor de calibración original puede ser aplicada como una corrección. El límite de detección para la metodología establecida para cadmio reportada por Skoog *et al.* Y, este a su vez de diferentes fuentes bibliográficas estandarizadas, es de ng/ml para el caso del cadmio (Skoog et al., 2015, p. 796).

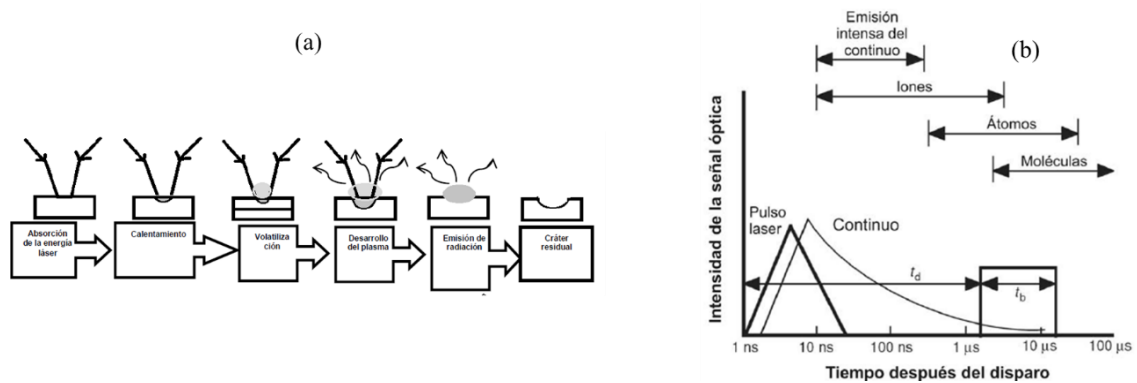
4.4 Espectroscopía de plasma inducida por láser LIBS

La Espectroscopía de plasma inducida por láser (LIBS) es una técnica espectroscópica de emisión atómica que hace posible determinar la composición elemental en “tiempo real” de cualquier tipo de sustancia sea sólida, líquida o gaseosa. Un láser de alta potencia se usa como fuente de radiación, muestreo y excitación, mediante la ablación de pequeñas cantidades de

material (picogramos o nanogramos), y la formación de un plasma. La formación del plasma se inicia con la absorción de la energía electromagnética por parte de la muestra. El haz láser incide sobre la superficie de la muestra con energía suficiente para generar el plasma, durante su enfriamiento se observa la emisión de especies iónicas, atómicas y fragmentos moleculares. Según la duración del pulso y la irradiancia (energía del pulso por unidad de área por unidad de tiempo), puede primar uno de dos procesos: evaporación o ablación. La ablación es una extracción de material por un proceso explosivo que ocurre cuando se focaliza un haz láser de pulsos cortos y de alta irradiancia, superiores a 10^9 W/m^2 , la superficie del material, se calienta instantáneamente al interactuar con la radiación electromagnética, alcanzando su temperatura de evaporación a través de una absorción no lineal fotónica (absorción multifotónica), presentándose una descomposición del material, el mecanismo se puede ver en la figura 3. La interacción explosiva, por otra parte, se describe como un mecanismo no térmico, se observa fundición alrededor del cráter, evaporación, expulsión de átomos, iones, fragmentos de materia, deformación del material y expansión del plasma. La mínima densidad de potencia para producir plasma, se denomina umbral del plasma (Celis, 2012; Thakur & Singh, 2007), en la figura 4 se puede observar un esquema del montaje típico para implementar la técnica LIBS.

Figura 3.

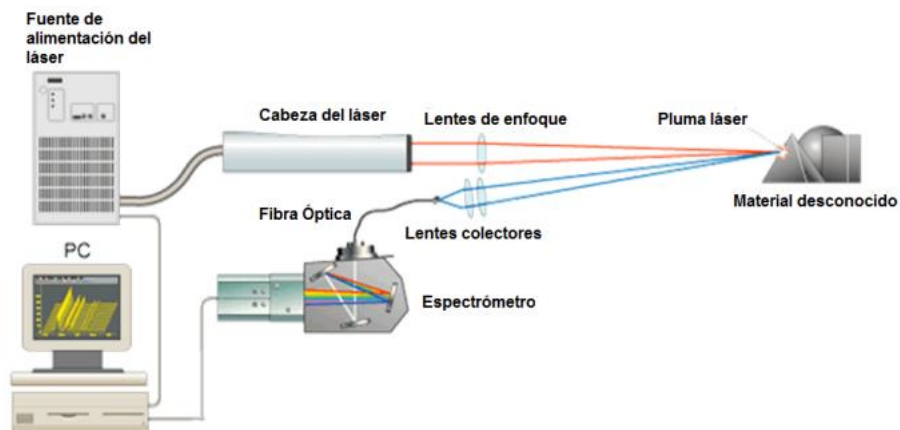
(a) Diagrama esquemático de la formación y evolución del plasma (b) evolución temporal del plasma



Nota. Gráfico (a) tomado de Análisis cualitativo y semi-cuantitativo de microfósiles provenientes del departamento de Boyacá utilizando Espectroscopía de μ -plasma inducida por láser (μ -LIBS) (p.20), por Sandra Herrera. Gráfico (b) tomado de “*Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals and Applications*” (p. 7)

Figura 4.

Esquema de un sistema LIBS típico (1) Láser de pulso cortó, (2) sistemas ópticos de enfoque del haz láser sobre la muestra, (3) un espectrómetro y (4) sistema de cómputo procesador de las señales.



Nota: Tomado de *Pozhidaev y Fatievskii, 1981*

Como el plasma es producido por una fuente pulsada el espectro resultante evoluciona rápidamente en el tiempo. En la práctica se deben tener en cuenta parámetros importantes como el

tiempo de retardo (t_d), que es el tiempo entre el inicio de la formación del plasma (incidencia del pulso láser) y el inicio de la observación de la radiación emitida, y el periodo durante el cual la radiación incide en el detector y genera el espectro o tiempo de integración (t_b); ambos del orden de microsegundos. Después del tiempo t_d y durante el periodo t_b las emisiones provenientes de especies atómicas son mucho más fuertes, siendo posible remover de los espectros la radiación inicial que es continua e interfiere la detección de los elementos presentes en la muestra cómo se describe en la figura 3(b). Una de las grandes ventajas de los plasmas inducidos por láser es el elevado poder emisor que presentan, al mismo tiempo que alcanzan altísimas temperaturas como consecuencia de la interacción láser – materia. Además, este plasma puede ser obtenido no sólo en muestras sólidas, sino también en líquidos, gases y aerosoles. Entre las principales ventajas de LIBS, se identifican la habilidad para detectar todos los elementos en forma simultánea, y comparado con otras técnicas espectroscópicas es conocido por su simplicidad, rápido análisis en tiempo real, nulo o muy poco tratamiento de la muestra, permite análisis *in situ*, su amplia adaptabilidad y pequeñas cantidades de muestra necesarias para su implementación, no obstante , esta técnica presenta algunas limitaciones como la dificultad de obtener estándares adecuados, por ello se considera una técnica semi-cuantitativa, su baja precisión la cual es típicamente del 5 al 10 % dependiendo de la homogeneidad de la matriz de la muestra y las propiedades de excitación del láser (Osorio *et al*, 2012). En la práctica algunos autores han llevado a cabo modelos cuantitativos en matrices metálicas, suelos, rocas e incluso alimentos (Tognoni et al., 2010), sin embargo, se considera una técnica más útil en el análisis cualitativo así como en la construcción de modelos a partir de la inclusión de métodos estadísticos y quimiometría, junto con técnicas analíticas más

robustas, para análisis de todo tipo de matrices, en especial matrices ambientales así como alimentos (Senesi et al., 2019).

4.4.1 Caracterización del plasma

4.4.1.1 Densidad electrónica

El ensanchamiento de las líneas espectrales emitidas por el átomo de hidrógeno depende fuertemente de la densidad de las partículas cargadas en su entorno. La degeneración de sus niveles provoca un efecto *Stark* lineal que produce una ampliación mucho más pronunciada que el presentado por los demás sistemas atómicos en los cuales el efecto *Stark* es cuadrático. En el átomo de hidrógeno, la línea $H\alpha$ es la más pronunciada en la serie de *Balmer* (656,273 nm) siendo por ello está la candidata para el cálculo del ensanchamiento Stark, despreciando la temperatura, podemos emplear la expresión de la ecuación (1) para calcular la densidad electrónica, n :

$$n \sim 10.22 \times 10^{22} (\Delta\lambda_{Stark}^{H\alpha})^{1.39} \text{ Ecuación (1)}$$

En la ecuación (1) la expresión $\Delta\lambda_{Stark}^{H\alpha}$ corresponde al ancho a media altura (FWHM) de la componente *lorentziana* de la transición y la expresión es una función que no tiene en cuenta la temperatura del plasma (Estrada, 2017. p.41; Miziolek *et al.*, 2006, p.131).

4.4.1.2 Densidad de la temperatura del plasma

En condiciones de LTE (Equilibrio término local) los niveles excitados para cada especie siguen una distribución de Boltzmann, Ecuación (2)

$$n_i^s = \frac{g_i}{U^s(T)} n^s e^{-E_i/kT} \text{ Ecuación (2)}$$

Dónde n_i^s corresponde a la densidad de población del nivel excitado i de la especie s , g_i y E_i corresponden al peso estadístico y la energía de excitación del nivel, respectivamente, n^s el número total densidad de las especies s en el plasma, k es la constante de Boltzmann y $U^s(T)$ es la función de partición interna de la especie a la temperatura T :

$$U^s(T) = \sum_i g_i e^{-E_i/kT} \text{ Ecuación (3)}$$

De aquí en adelante el estado fundamental del átomo o ion corresponde al estado de energía cero. La condición de que los estados atómicos e iónicos sean poblados y despoblados predominantemente por colisiones de electrones, más que por radiación, requiere una densidad de electrones que sea suficiente para asegurar una alta tasa de colisiones. El correspondiente límite inferior de la densidad de electrones n_e viene dado (cm^{-3}) por el criterio de McWhirter:

$$n_e \geq 1.6 \times 10^{12} T^{\frac{1}{2}} (\Delta E)^3 \text{ Ecuación (4)}$$

Dónde ΔE (Ev) es la energía superior de transición para la que se cumple la condición, y T (K) es la temperatura del plasma. Este criterio es una condición necesaria, aunque insuficiente, para LTE, y suele cumplirse durante las primeras etapas de la vida del plasma. Sin embargo, es difícil de satisfacer para los estados bajos, donde ΔE es grande. Sin embargo, para cualquier n_e , es posible encontrar niveles de excitación altos donde los estados están lo suficientemente cerca para que la ecuación (4) se cumpla. En este caso, se dice que el plasma está en LTE parcial.

Siempre que se cumpla la hipótesis de LTE descrita anteriormente, la temperatura del plasma puede calcularse a partir de la relación de intensidad de un par de líneas espectrales originadas en diferentes niveles superiores del mismo elemento y etapa de ionización. De hecho, suponiendo que la población de niveles obedece a una distribución de Boltzmann (ecuación (2)),

la emisividad radiante total integrada espectralmente ($\text{W m}^{-3} \text{sr}^{-1}$) correspondiente a la transición entre el nivel superior i y el nivel inferior j viene dada por:

$$e = \left(\frac{hc}{4\pi}\right) \frac{A_{ij}g_i}{\lambda_{ij}U^s(T)} n^s e^{-E_i/kT} \text{ Ecuación (5)}$$

Dónde λ_{ij} , A_{ij} y g_i son la longitud de onda, la probabilidad de transición y el peso estadístico para el nivel superior; c es la velocidad de la luz, y los demás símbolos ya han sido definidos previamente. Con los detectores típicamente utilizados en las mediciones LIBS, se prefiere una fórmula alternativa en términos de intensidad de línea integrada (número de transiciones por unidad de volumen por unidad de tiempo), es decir:

$$I_{ij} = n_i^s A_{ij} = \frac{A_{ij}g_i}{U^s(T)} n^s e^{-E_i/kT} \text{ Ecuación (6)}$$

Ahora, considerando dos líneas, λ_i y λ_m , de la misma especie, caracterizadas por diferentes valores de la energía del nivel superior ($E_i \neq E_m$), se puede utilizar la relación de intensidad relativa para calcular la temperatura del plasma (Estupiñán *et al.*, 2009; Miziolek *et al.* 2006. p. 130), ver ecuación (7):

$$T = \frac{E_i - E_m}{k \ln\left(\frac{I_{mn}A_{ji}g_i}{I_{ij}A_{mn}g_m}\right)} \text{ Ecuación (7)}$$

4.5 Quimiometría

La quimiometría es una disciplina metrológica que aplica conocimientos matemáticos, especialmente estadísticos, a procesos químicos, para extraer de los datos experimentales la mayor cantidad posible de información y extender el conocimiento del sistema químico (Mongay, 2005).

p. 19). Para el caso de la química analítica, los métodos quimiométricos hacen uso de las relaciones entre la señal obtenida y una propiedad del sistema estudiado (generalmente, concentración). El término de quimiometría fue introducida en 1972 por el sueco Svante Wold y el estadounidense Bruce R. Kowalski. En 1974 la fundación de la sociedad internacional de quimiometría condujo la primera descripción de esta disciplina. Y desde entonces con el avance en los medios computacionales se ha potencializado su alcance. (Alciaturi *et al.*, 2003).

4.5.1 Métodos multivariados para la construcción de modelos predictivos

Uno de los objetivos principales de la quimiometría es la construcción de modelos predictivos. En la literatura se encuentran numerosas referencias a métodos de análisis multivariado, entre ellos PLS (Mínimos cuadrados parciales). En estos métodos, se consideran dos grupos de variables, llamadas variables independientes (representadas por una matriz X) y variables dependientes (representadas por la matriz Y). Tomando un conjunto de muestras, a las cuales se les determina los valores de X y Y (por ejemplo, X puede representar las intensidades de absorción medidas por un espectrofotómetro, y Y las concentraciones de ciertos componentes, determinadas por gravimetría, titulación u otro método) se trata de establecer un modelo (generalmente lineal) $Y = f(X)$. Este conjunto de muestras es llamado conjunto de calibración o de entrenamiento.

En el caso de un modelo lineal, con una variable dependiente representado por la Ecuación (8) (dónde las letras mayúsculas representan matrices, y las minúsculas vectores):

$$y = X\beta + f \quad \text{Ecuación (8)}$$

y Representa la variable dependiente, X representa las variables independientes, β es el vector solución y f el vector error o residual. Esta ecuación se muestra gráficamente en la Figura

5. Los parámetros del modelo (contenidos en β) son llamados coeficientes de regresión o sensibilidades.

Figura 5.

Representación gráfica de la ecuación (1).

Diagrama que representa la ecuación (1) con una matriz X alta y delgada. A la izquierda, un rectángulo rojo vertical etiquetado con y tiene el número n debajo de él. A la derecha de y está un signo de igualdad. A la izquierda de la igualdad es un rectángulo verde vertical etiquetado con X que tiene n debajo y m a la derecha. A la derecha de X es un rectángulo negro vertical etiquetado con β que tiene m debajo. A la derecha de β está un signo de suma. A la derecha de la suma es un rectángulo negro vertical etiquetado con f que tiene n debajo. Debajo del rectángulo f está el texto $(n > m)$.

Nota. (a) X es una matriz “alta” y “delgada”. Generalmente existe una única solución de mínimos cuadrados para la Ecuación (1), con $f \neq 0$

Diagrama que representa la ecuación (1) con una matriz X baja y gruesa. A la izquierda, un rectángulo rojo vertical etiquetado con y tiene el número n debajo de él. A la derecha de y está un signo de igualdad. A la izquierda de la igualdad es un rectángulo verde horizontal etiquetado con X que tiene n debajo y m a la derecha. A la derecha de X es un rectángulo negro vertical etiquetado con β que tiene m debajo. A la derecha de β está un signo de suma. A la derecha de la suma es un rectángulo negro vertical etiquetado con f que tiene n debajo. Debajo del rectángulo f está el texto $(m > n)$.

Nota. (b) X es una matriz “baja” y “gruesa”. Generalmente existen infinitas soluciones para la Ecuación (1), con $f = 0$

Para reducir la gran cantidad de variables independientes producto de los resultados espectroscópicos, por ejemplo, se trabaja con variables latentes como es el caso de (PLS), estos conceptos se describen con mayor profundidad en el siguiente apartado (Alciaturi et al., 2003).

4.5.2 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

Generalmente en el tratamiento PLS las dos matrices involucradas tienen diferente dimensionalidad, por lo cual calcula otro tipo de variable conocida como variable latente (LV), estos factores o variables latentes, corresponden a variables no observables, que son inferidas a partir de un modelo matemático (Alciaturi *et al.*, 2003). En el caso del modelo PLS-1 se considera una sola variable dependiente representada por el vector y , en estos modelos se establece una representación de la matriz X en términos de estas variables latentes (LVs).

$$X = TP^T + E \quad \text{Ecuación (9)}$$

Dónde T representa “scores” (término que puede ser traducido como puntajes); el término P^T “loadings” (término que puede ser traducido como cargas) y E representa la matriz de errores o residuales. La matriz X queda descompuesta en un numero de variables latentes (Lvs) cada una caracterizada por un vector t y un vector p^t .

De esta forma, es posible representar una matriz X (dentro de un cierto error) por una matriz T con un número menor de columnas. Esta descomposición se muestra en la figura 6. El modelo PLS-1 se desarrolla de modo que las primeras variables latentes (t_1, t_2, \dots, t_n) son las más importantes para explicar el vector “ y ” en el conjunto de calibración. El número de variables latentes necesarias para explicar la matriz X (dentro de un error máximo permitido) es una medida de la complejidad del modelo. Otros vectores calculados durante la etapa de calibración son w^T (“pesos” en el espacio de X), y b (“sensibilidades”).

Figura 6.

Descomposición de la matriz X

$$\begin{aligned}
 \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{X}} \\ n \end{matrix} &= \begin{matrix} a \\ \boxed{\mathbf{T}} \\ n \end{matrix} \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{P}^T} \\ a \end{matrix} + \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{E}} \\ n \end{matrix} \\
 &= \begin{matrix} \boxed{\mathbf{t}_1} \\ n \end{matrix} \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{p}_1^T} \\ \end{matrix} + \begin{matrix} \boxed{\mathbf{t}_2} \\ n \end{matrix} \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{p}_2^T} \\ \end{matrix} \\
 &+ \dots + \begin{matrix} \boxed{\mathbf{t}_a} \\ n \end{matrix} \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{p}_a^T} \\ \end{matrix} + \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{E}} \\ n \end{matrix}
 \end{aligned}$$

Nota. En el gráfico, la matriz X es descompuesta en “scores” (t) y loadings (p). La matriz T contiene un número a de scores, con $a < m$.

A partir de un conjunto de calibración, se crea el modelo PLS y aplica a los datos de calibración y a los datos de prueba. Durante el desarrollo del modelo, se calcula un número relativamente pequeño de componentes PLS (variables latentes lineales intermedias) que se utilizan internamente para la regresión. El número de componentes PLS determina la complejidad del modelo y puede optimizarse para un alto rendimiento de predicción. La relación entre y y T es:

$$y = Tb + f \text{ Ecuación (10)}$$

Dónde b se calcula de modo que sea posible minimizar f , el vector error en esta expresión. Los vectores w^T , p^T , y b son necesarios para predecir la propiedad dependiente y para un nuevo conjunto de muestras. En ese caso, se determina experimentalmente X y se calcula (utilizando los

vectores w' y p') la matriz T . El vector y es estimado usando los coeficientes b previamente calculados durante la calibración.

$$y_{pred} = Tb \text{ Ecuación (11)}$$

Es importante recalcar que los vectores t (“scores”) son ortogonales entre sí; los vectores w^T (“weights”) son ortogonales entre sí; el residual f es ortogonal a los t previos, y el número máximo de variables latentes no excede el rango de la matriz X .

4.5.3 SIMPLS Algoritmo para PLS

Este algoritmo diseñado por Jong (1993) permite la implementación directa de una modificación estadísticamente inspirada en el método PLS de acuerdo con la maximización del problema inicial de la ecuación (12):

$$\text{cov}(Xw, Yc) \longrightarrow \text{máx} \quad \|t\| = \|Xw\| = 1 \quad ; \quad \|u\| = \|Yc\| = 1 \text{ Ecuación (12)}$$

Bajo la restricción de ortogonalidad de los puntajes t para diferentes componentes. El primer componente PLS de SIMPLS es idéntico al resultado de NIPALS o el algoritmo de Kernel. En SIMPLS no hay deflación de los datos centrados en las matrices X y Y realizados, pero la deflación se lleva a cabo por la matriz de covarianza, o matriz de productos cruzados $S = X^T Y$, entre datos- x y datos- y . El pseudocódigo para el algoritmo SIMPLS es el siguiente:

1. Inicia con $S_0 = X^T Y$ y se repiten los pasos 2 a 6 para $j = 1, \dots, a$
2. Si $j = 1$, $S_j = S_0$; si $j > 1$, $S_j = S_{j-1} - P_{j-1} (P_{j-1}^T P_{j-1})^{-1} P_{j-1}^T S_{j-1}$
3. Estima w_j como el primer vector singular de S_j
4. $w_j = w_j / \|w_j\|$
5. $t_j = X w_j$

$$6. t_j = t_j / \| t_j \|$$

$$7. P_j = X_j^T t_j$$

$$8. P_j = [P_1, P_2, \dots, P_{j-1}]$$

Los pesos resultantes w_j y Scores t_j se almacenan como columnas en las matrices W y T , respectivamente. W difiere de los algoritmos anteriores, porque los pesos están directamente relacionados con X y no con las matrices deflactadas. El paso 2 explica la restricción de ortogonalidad de los Scores t_j a todos los vectores de Scores anteriores, ya que la búsqueda se realiza en el componente ortogonal S_{j-1} . El paso 3 maximiza el problema inicial (Ecuación (9)). Las puntuaciones en el paso 4, se obtienen proyectando directamente con X en la dirección óptima, y las cargas en el paso 5, se obtienen por regresión OLS para el modelo.

4.5.4 Evaluación y Optimización de Modelos de Calibración (Estadística)

Se utilizan varios métodos estadísticos para evaluar y optimizar el rendimiento de los modelos de calibración multivariante. Estos métodos, se aplican generalmente sólo a los datos del conjunto de calibración; no deben confundirse con los métodos que se utilizan para validar el modelo, que se calculan a partir de un conjunto de validación analizado por separado (E1655, ASTM, 2021. p. 12).

4.5.4.1 Error estándar de calibración (SEC)

Si \hat{y} son los valores estimados para las muestras de calibración, e y son los valores de referencias correspondientes, entonces e es el vector de error de calibración definido por:

$$e = \hat{y} - y \text{ Ecuación (13)}$$

Los errores de predicción incluyen contribuciones de errores en los valores de referencia para el conjunto de calibración, errores espectrales en los espectros del conjunto de calibración y errores del modelo (uso de un número incorrecto de variables), relaciones o lineales, etc.

El error estándar de calibración se define como:

$$SEC = \sqrt{\frac{e^t e}{d}} = \sqrt{\frac{1}{d} \sum_{i=1}^{n^t} (\hat{y} - y_i)^2} \quad \text{Ecuación (14)}$$

Dónde d es el número de grados de libertad en el modelo de calibración; d es típicamente igual a $n - k$, dónde n es el número de muestras de calibración, y k es el número de variables usadas en el modelo. El error estándar de calibración se utiliza para estimar la correlación esperada entre los valores estimados mediante los modelos de calibración y los valores que se medirían con el método de referencia (ASTM E1655, 2017, p.12). En la ecuación (14), \hat{y} es el vector que contiene las estimaciones de la calibración.

4.5.4.2 Error estándar de validación cruzada (SECV)

Los procedimientos de validación cruzada también se utilizan para estimar el número óptimo de variables que deben incluirse en un modelo. En la validación cruzada, se eliminan de la matriz de datos uno o más espectros de muestras de la matriz de datos, sus correspondientes valores de referencia se eliminan del vector de valores de referencia, y se construye un modelo con las muestras restantes, el modelo de validación, el modelo se utiliza para estimar el valor de las muestras que se han eliminado. Este proceso se repite hasta que cada muestra se haya omitido una vez, el error de la validación cruzada, SECV, se calcula entonces como:

$$SECV = \sqrt{\frac{1}{d} \sum_{i=1}^{n_{cv}} (\hat{y} - y_i)^2} \quad \text{Ecuación (15)}$$

En la ecuación (8) donde \hat{y} es el vector que contiene las estimaciones de validación cruzada, y d corresponde al número de grados de libertad.(E1655, ASTM, 2021, p. 14).

4.5.4.3 Límites de confianza para un valor estimado

El límite de confianza para un valor estimado por un modelo multivariado viene dado por:

$$t \cdot SEC \cdot \sqrt{1 + h} \quad \text{Ecuación (16)}$$

Dónde t es el valor de “*t student*” para el número de grados de libertad en el modelo, y h es el “*leverage estadístico*”(El estadístico de apalancamiento) definido como: una medida escalar de dónde se encuentra el vector espectral x dentro del espacio de parámetros multivariante utilizado en el modelo, y se utiliza para detectar valores atípicos durante la calibración. El límite de confianza para un valor estimado en la Ecuación (16) se denominan a veces bandas de confianza o intervalos de confianza para la estimación.

4.5.4.4 Estadísticas adicionales para la evaluación del modelo matemático

Para evaluar los modelos de calibración se utilizan diversas pruebas estadísticas. Algunas pruebas de uso común son Coeficiente de determinación para el conjunto de datos de entrenamiento R^2_C y validación R^2_{CV} , Error estándar de calibración (error estándar de estimación, ecuación 17)

$$RPD = \frac{SD_y}{SECV} \quad \text{Ecuación (17)}$$

Dónde SD_y corresponde a la desviación estándar. Evaluación del error de rango (RER, ecuación 18);

$$RER = \frac{(y_{max} - y_{min})}{SECV} \quad \text{Ecuación (18)}$$

Según el método 39-00 de la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC), cualquier modelo que tenga $RER \geq 4$ está calificado para la calibración de cribado. Cuando $RER \geq 10$, el modelo es aceptable para el control de calidad, y si $RER \geq 15$, el modelo es muy bueno para la investigación cuantificación (Hashimoto *et al.*, 2018).

Otra métrica para estimar el ajuste del modelo corresponde a la prueba F (*goodness-of-fit*), la cual se define en la ecuación (19):

$$F(p - 1, n - p) = \frac{SS_{fact}/(p-1)}{SS_R/(p-1)} \text{ Ecuación (19)}$$

Dónde SS_{fact} y SS_R son la suma de cuadrados de los factores y de los residuales, respectivamente, n y p son el número de muestras de calibración (entrenamiento) y p el número de variables latentes. Un $F > 100$ da cuenta de un ajuste aceptable (E1655, ASTM, 2021, p.28).

5. Metodología

A continuación, se hace una descripción por etapas del trabajo de investigación realizado para lograr la elaboración de un modelo predictivo que permita la determinación de la concentración de cadmio en muestras de almendras de cacao de una forma ágil, sencilla, y con la mínima cantidad de sustancias químicas en dicho proceso, mediante la implementación de las

técnicas LIBS (Espectroscopia de plasma inducida por láser) y F-AAS, (Espectroscopía de Absorción Atómica con llama).

Para los análisis realizados por LIBS y F-AAS, se contó con 65 muestras de cacao de origen desconocido, para el caso de la determinación de cadmio en cacao, todas las muestras se analizaron por triplicado para las dos técnicas seleccionadas.

Previo al proceso de estructuración del modelo predictivo para la determinación de cadmio en almendras de cacao, se llevó a cabo un análisis cualitativo de las muestras, así como la identificación de las variables óptimas para las dos técnicas implementadas, lo cual será tratado

5. 1 Análisis cualitativo de muestras de cacao

5.1.1 Homogeneización de las muestras

Las almendras o frutos de cacao son recolectadas de forma manual, de su interior se extrae los granos, junto con la pulpa, estos se pasan al proceso de fermentación, posteriormente, se procede al secado donde se reduce los niveles de humedad del 60% al 7% y finalmente se pasa a la etapa de añejamiento donde se cuida que la humedad no supere el 8%.

Posteriormente, estos granos pasan por un proceso de tostado, y finalmente descascarillado, este producto es la matriz que se procederá a analizar, en el laboratorio donde se lleva a cabo una molienda más fina en mortero que permite homogenizar la muestra (Bravo, *et al.*, 2021).

Para la identificación de la composición elemental se llevó a cabo un análisis cualitativo de las muestras de cacao implementando dos (2) métodos de preparación de la muestra: pastilla de cacao generada en prensa hidráulica y análisis cualitativo del líquido extraído en portamuestras

de vidrio producto del tratamiento de transformación Sólido-Líquido-Sólido (S-L-S) con una solución de ácido clorhídrico 0,1 N.

Para la elaboración de la pastilla, se pesó 500 mg de muestra de cacao previamente homogeneizado, este se sometió a una presión de 2 ton/cm² por 2 minutos en la prensa hidráulica, esta pastilla de 2mm de espesor se ubicó en el porta muestras con sistema de rotación observado en la figura 7 (a) y (b). Los parámetros instrumentales del sistema LIBS se pueden observar en la tabla 1.

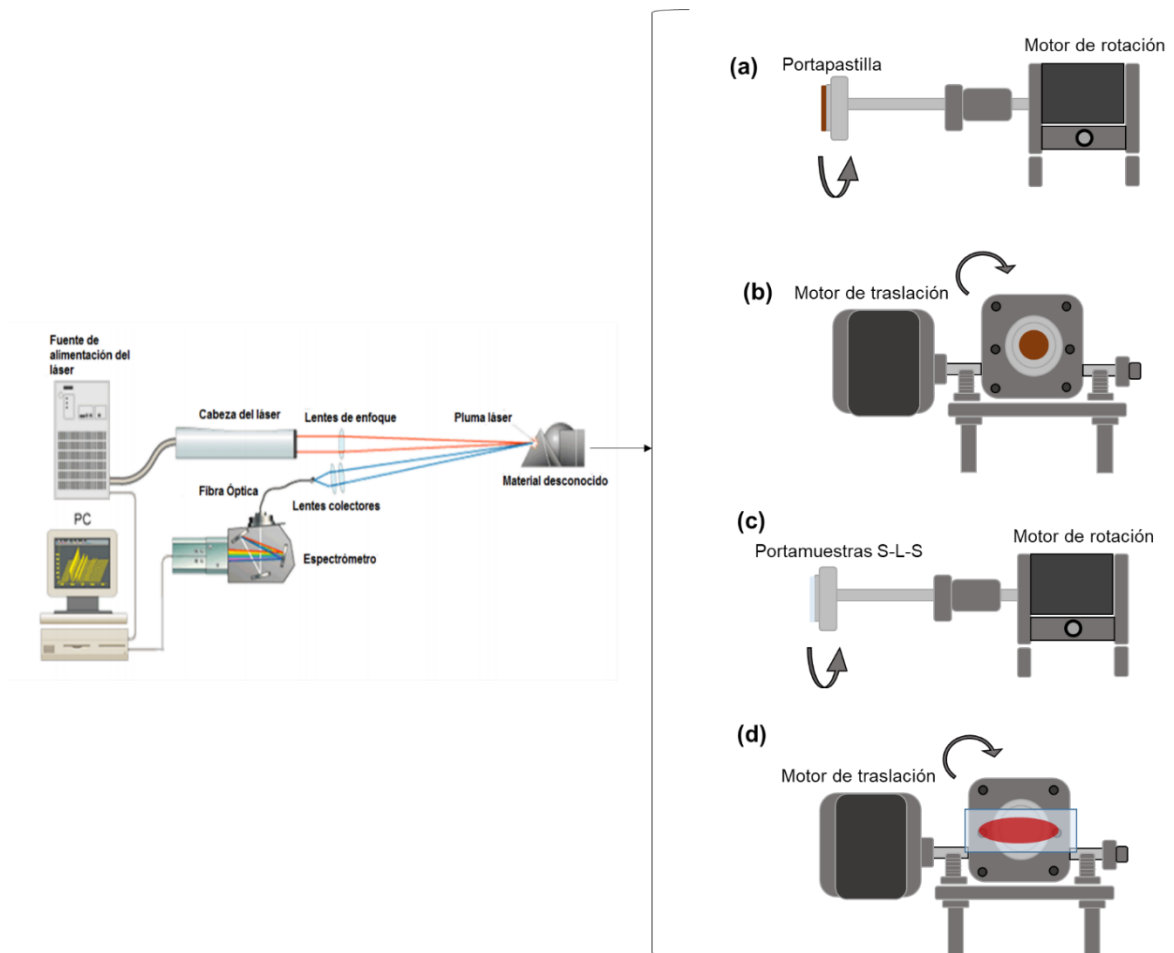
Tabla 1.

Los parámetros instrumentales del sistema LIBS para análisis cualitativo de cacao en pastilla

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
<i>Longitud de Onda</i>	1064 nm
<i>Tiempo de retardo</i>	1 μs
<i>Tiempo de integración</i>	5 μs
<i>Distancia focal</i>	19 cm
<i>Número de disparos</i>	3 disparos

Figura 7.

Sistema LIBS para análisis de muestras de almendra de cacao.



Nota: (a) Visión lateral de pastilla (b) Visión frontal de la pastilla; (c) Visión lateral del portamuestras de vidrio; (d) Visión frontal del portamuestras de vidrio.

Por otro lado, para el caso del proceso de transformación Sólido-Líquido-Sólido (S-L-S) se tomó 1 gramo de muestra de cacao previamente macerada, se agregó 14 mL de solución HCl 0.1 N, se sometió a centrifugación a 8000 rpm por 20 minutos y el líquido sobrenadante se depositó en un portamuestras de vidrio en 5 capas de 200 μ L cada una las cuales se dejaron secar capa a

capa por 5 minutos a 70 °C en una manta de calentamiento (Ferreira de Oliveira et al., 2021). Los parámetros para el análisis cualitativo de la muestra de almendra de cacao en el porta muestras de vidrio se describen a continuación en la tabla 2. Se utilizó el mismo montaje implementado para el caso de la pastilla, la diferencia entre los montajes corresponde al portamuestras de vidrio en lugar de porta pastillas, ver figura 7(c) y (d).

Tabla 2.

Los parámetros instrumentales del sistema LIBS para análisis cualitativo de cacao en porta muestras de vidrio posterior transformación S-L-S

PARÁMETRO	VALOR
LONGITUD DE ONDA	1064nm
TIEMPO DE RETARDO	400 ns
TIEMPO DE INTEGRACIÓN	5 μ s
DISTANCIA FOCAL	18 cm
NÚMERO DE DISPAROS	10 disparos
ENERGÍA	150 mJ

El análisis cualitativo por medio de LIBS para las dos metodologías de preparación de muestra se llevó a cabo la con la rejilla de 2400 líneas/mm que tiene un *blaze* de 250nm y se llevó a cabo cada 10 nm completando un barrido total desde los 200 nm hasta los 700 nm.

5.1.2 Análisis espectral

Los espectros obtenidos para el barrido desde 200 hasta 700 nm de las muestras de cacao correspondientes a las dos metodologías de preparación, fueron analizados en el software Origin Pro 8.5 realizando un suavizado por medio del método de Savitzky-Golay de polinomio de grado 2 y 7 puntos de ventana. Este procesamiento fue aplicado únicamente para el análisis cualitativo. Dado que la relación señal/ruido de las muestras de pastilla era muy baja.

5.2 Determinación de Cadmio por LIBS (Espectroscopía de plasma inducida por láser)

Para la determinación de cadmio en muestras de cacao se hizo una exploración a través de diversas metodologías de preparación de la muestra con el objetivo de identificar cual permitía evidenciar líneas de emisión de dicho elemento con mayor certeza.

5.2.1 Determinación de Cadmio en pastillas de cacao

En Espectroscopía de plasma inducida por láser el proceso más conocido para el análisis de todo tipo de muestras, es la formación de pastillas, una vez homogeneizado el material, ejerciendo presión en un molde, sin embargo, las muestras analizadas en forma de pastilla tienen usualmente algunas dificultades para la determinación de ciertos elementos (Senesi et al., 2019; Sezer et al., 2017; Yang et al., 2018).

Inicialmente, con el objetivo de verificar si era posible detectar alguna de las líneas de emisión de Cadmio, se llevó a cabo la generación de una pastilla partiendo de 500 mg de cacao previamente macerado, para llevar a cabo la construcción de dicha pastilla se utilizó una prensa hidráulica con una presión de 2 ton/cm² por 2 minutos, en este tratamiento se encontró una dificultad particular puesto que por la gran cantidad de grasa de las muestras de cacao, este trata escaparse del molde dejando pastillas finalmente de 2 mm de espesor.

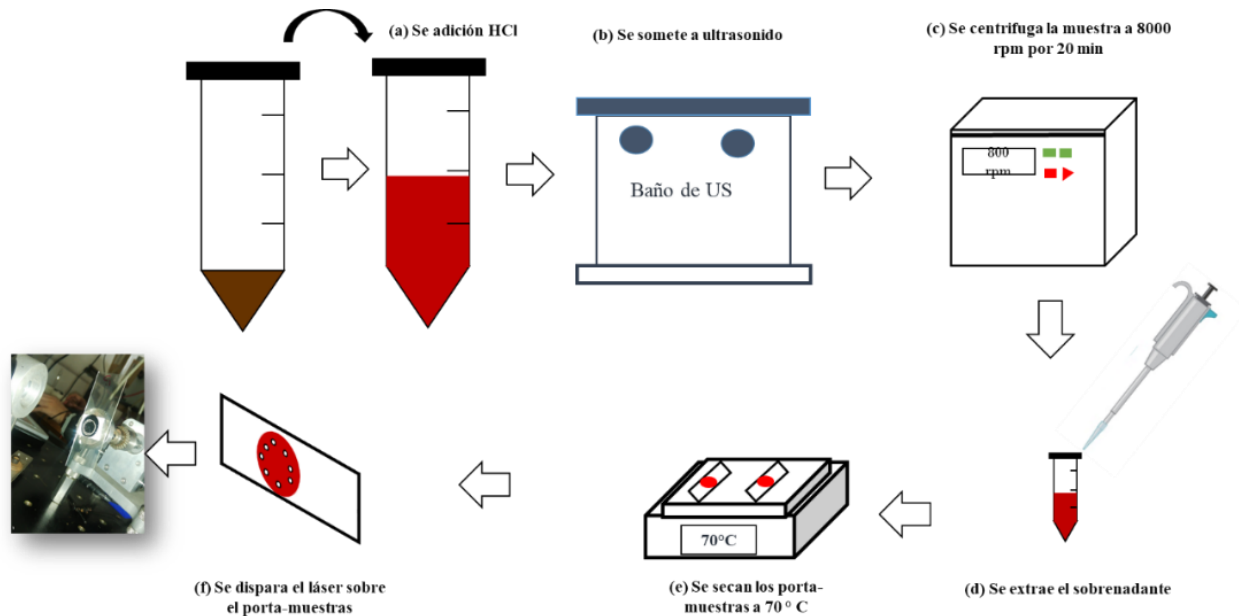
Para verificar la presencia de cadmio se contaminó varias muestras de cacao con una solución estándar de cadmio de la siguiente forma: 0, 0.5 mL, 1 mL, 2 mL de solución de CdCl_2 100 ppm. Dichas muestras se sometieron a eliminación del exceso de líquido a través de dos procesos, secado en estufa a 60°C por 4 horas y liofilización. Posterior a la eliminación del exceso de agua, se elaboró la pastilla bajo las mismas condiciones iniciales.

5.2.2 Transformación Sólido-líquido-sólido

Este proceso se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones de tratamiento estipuladas por Yang y su equipo de trabajo en muestras de arroz (Yang *et al.*, 2019), se pesó 1 gramo de cada muestra de cacao previamente macerado, en un recipiente de polipropileno para centrifuga, se adiciona un volumen de solución de HCl 0.1 N, se somete a un baño de ultrasonido, se centrifuga y se toma del sobrenadante 200 μL en 5 capas sobre un portamuestras de vidrio previamente limpiado con papel de lija de carburo de silicio de grano 1200 (SiC) y luego se lavó con alcohol isopropílico tres veces para eliminar las impurezas de la superficie. Este porta muestras se somete a calentamiento a 70°C por 2 minutos cada capa, hasta obtener una capa sólida y seca sobre la cual se disparará el láser. En la figura 8 se puede observar el paso a paso de la metodología de transformación S-L-S.

Figura 8.

Procedimiento de transformación Sólido-Líquido-Sólido (S-L-S) para muestras de cacao.



Nota: Tratamiento de transformación sólido-líquido –sólido extraído del artículo High-sensitivity determination of cadmium and lead in rice using laser induced breakdown spectroscopy. Food Chemistry. 2019. Yang P. *et al.*

Para determinar los parámetros óptimos para la identificación de líneas de emisión de cadmio se evaluaron los siguientes parámetros experimentales e instrumentales

5.2.2.1 Volumen adicionado de HCl 0.1 N

Para determinar el volumen óptimo de transformación se adicionaron los siguientes volúmenes de solución HCl 0.1 N: 10, 12, 14 y 16 ml a una muestra de 1 gramos de cacao con alta concentración de cadmio medida por absorción atómica, Se tomaron los espectros LIBS con 100 disparos a una distancia focal de 19 cm, y tiempo de retardo de 200 ns en las ventanas de 214 y 226 nm para evaluar las líneas de emisión 214.44 nm, 226.55 nm y 228.88 nm.

5.2.2.2 Tiempo de ultrasonido (US)

Para determinar el tiempo de ultrasonido (US) empleado para extraer el cadmio del cacao se evaluó 5, 10, 15 y 20 minutos de US, para 1 g de cacao con alta concentración de cadmio medida por absorción atómica, Se tomaron los espectros LIBS con 100 disparos a una distancia focal de 19 cm, y tiempo de retardo de 200 ns. en las ventanas de 214 y 226 nm para evaluar las líneas de emisión 214.44 nm, 226.55 nm y 228.88 nm.

5.2.2.3 Número de capas

Se evaluó la emisión de las líneas 214.44 nm, 226.55 nm y 228.88 nm desde 1 hasta 5 capas cada una de 200 μ L de solución para 1 g de cacao con alta concentración de cadmio medida por absorción atómica, Se tomaron los espectros LIBS con 100 disparos a una distancia focal de 19 cm, y tiempo de retardo de 200 ns.

5.2.2.4 Tiempo de retardo

Para evaluar el área bajo la curva de las líneas de emisión para cadmio se tomó una muestra de 5 capas de solución a una distancia focal de 19.5 cm, con 100 disparos a tiempos de retardo de 200, 400, 800, y 1000 ns.

5.2.2.5 Distancia lente-portamuestras

Se evaluó la distancia de la lente de enfoque a la muestra variando desde 18 a 19.5 cm con una muestra de 1 gramos de cacao, espectros tomados a 1000 ns como tiempo de retardo

5.2.2.6 Número de disparos

Se evaluó el número de disparos variando desde 10, 50, 150 y 200 disparos a un portamuestras de vidrio para la construcción de un solo espectro, tomados a un tiempo de retardo de 400 ns, una distancia lente muestra de 19,5 cm en muestras de 5 capas de líquido de

transformación. Estas pruebas se realizaron por triplicado y se promedió el área bajo la curva de cada línea de emisión

5.3 Construcción de un modelo predictivo para determinación de concentración de Cadmio implementando LIBS, F-AAS y métodos quimiométricos

Una vez encontrados los parámetros que permiten la identificación de cadmio por medio de LIBS (Espectroscopía de plasma inducida por láser) en muestras de cacao se procedió al análisis de las mismas por Absorción atómica (AAS), para ello se estudiaron los parámetros óptimos para el proceso de digestión asistida por microondas (MWAD) como técnica de preparación de la muestra sugerida por la norma AOAC 911.0. El cacao es una muestra compleja que tiene porcentajes de grasa superiores al 40% de su peso (AOAC, 1999), por lo que dicha norma no puede ser aplicada literalmente, es por ello que se procedió a implementar mayores tiempos de digestión de acuerdo a lo estipulado por Ferreira *et al.* (Ferreira de Oliveira *et al.*, 2021).

5.3.1 Determinación de cadmio por digestión asistida por microondas y posterior análisis por Absorción atómica

Para poder realizar la digestión completa del cacao por medio de MWAD se dejaron las muestras con Ácido nítrico (HNO₃) concentrado durante 48 horas de acuerdo a lo sugerido por Ferreira, en los recipientes de teflón previamente lavados; una vez cumplido este periodo de tiempo se procedió a la adición de H₂O₂ y digestión de acuerdo al programa sugerido en la tabla 3 (Ferreira de Oliveira *et al.*, 2021).

Toda el agua utilizada en la preparación de las muestras y la limpieza de la cristalería en este estudio fue agua tipo I (0,0056 µS/cm a 25 °C). Para evitar la contaminación por trazas de metales, el proceso de lavado es el siguiente:

a) Lavado de recipientes de vidrio:

Lavado con agua y detergente

Lavado con agua destilada

Lavado con agua tipo I

Lavado con solución de ácido nítrico HNO₃ al 20%

Enjuagar 4 a 5 veces con agua desionizada tipo I

b) Lavado recipientes de teflón

Lavado con agua y detergente

Lavado con agua destilada

Lavado con agua desionizada tipo I

Mantenerlo cubierto con HNO₃ 0.1 M por al menos 30 minutos

Se enjuagan de 4 a 5 veces con agua desionizada Tipo I

Se dejan secar

Tabla 3.

Programación de la digestión asistida por microondas en el equipo

PASO	RAMPA (MIN)	TEMPERATURA FINAL	TIEMPO DURACIÓN (MIN)
1	5	80	5
2	5	150	5
3	3	180	25

Los recipientes de teflón se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se abrieron cuidadosamente, el producto de la digestión se trasladó a un balón aforado de 25 mL y se aforo con HNO₃ al 0,5%.

5.3.2 *Análisis por Absorción atómica*

Los análisis de la concentración de cadmio en las muestras de cacao se llevaron a cabo en el espectrofotómetro *Thermo Scientific S Series*, equipo de absorción atómica con llama, adscrito a la escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander. Los parámetros de medición se describen en la tabla 4.

La curva de calibración se construyó con la dilución del material estándar de cadmio polvo grueso para el análisis y para el llenado del reductor tamaño de partícula alrededor de 0,3 - 1,6 mm de Cadmio *EMSURE® Merck KGaA, Darmstadt, Alemania*.

Se disolvió 1.00 g de Cadmio en un volumen mínimo de ácido nítrico 1:1. Este se diluyó a un litro para obtener una solución 1000 ppm de Cadmio, a partir de esta solución estándar se prepararon 6 patrones para la curva de calibración dentro del rango de concentraciones óptimas recomendadas por el fabricante del equipo para la detección en la longitud de onda de 228.8 nm el cual es de 0.02 a 3 ppm.

Tabla 4.

Patrones para curva de calibración

Patrón	Concentración (ppm)
1	0,02
2	0,5

3	1
4	1,5
5	2
6	3

Los blancos fueron preparados siguiendo todo el proceso descrito de *MWAD* exceptuando la adición de cacao. Los parámetros instrumentales se describen en la tabla 5.

Tabla 5.

Condiciones de trabajo espectrómetro AAS

Parámetro	Valor
Corriente Lámpara	4 mA
Estequiometria de la llama	Oxidante
Longitud de onda medición	228.88
Rendija	0.5 mm
Número de re-muestras	2
Tiempo de medición	4 segundos
Tipo llama	Aire / Acetileno
Flujo combustible	1.2 L/min
Altura de la llama	7.0 mm

Se realizaron mediciones en grupos de 42 muestras (3 réplicas de cada muestra de cacao) con la misma curva de calibración y el mismo blanco.

Para verificar la precisión y exactitud de dicha metodología se realizó la determinación del coeficiente de variación, la desviación estándar, el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Adicionalmente se determinó el porcentaje de recuperación de que consiste en determinar la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente un analito que ha sido adicionado a una muestra y se determinó como $\%R = (C_2 - C_1)/C_a$. Dónde C_2 es la concentración final medida a la muestra fortificada, C_1 es la concentración de la muestra sin fortificar y C_a es la concentración adicionada que en este caso es de 1 ppm, este proceso se realizó por triplicado y se trabajó con la concentración promedio.

5.3.3 Aplicación de métodos quimiométricos

A continuación se describe la construcción del modelo predictivo para la determinación de la concentración de cadmio en cacao mediante LIBS y AAS, se llevó a cabo mediante la aplicación de PLS-R (PLS-1) y 46 muestras con rangos de concentración entre 0 y 1 ppm de Cadmio.

5.3.3.1 Pre-procesamiento espectral

Para las muestras de cacao identificadas se llevó a cabo la adquisición de espectros en dos ventanas espectrales de emisión de cadmio, las ventanas 214 y 226 nm, donde se pueden identificar las líneas de emisión 214.44 nm y 226.5 nm, paradójicamente, aunque en AAS la línea de interés es la línea de 228,88 nm, esta no se tomó en cuenta debido a la interferencia con las líneas de emisión del hierro.

Tabla 6.

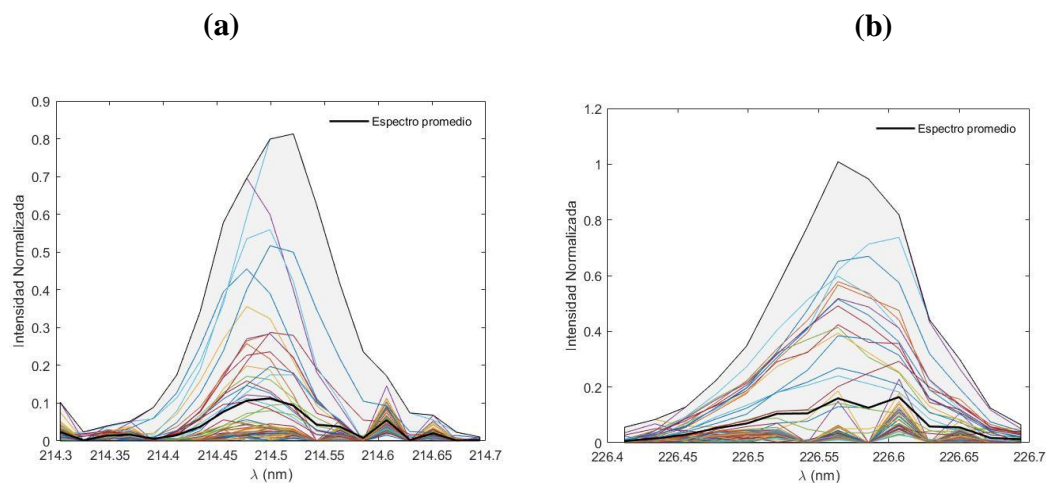
Regiones de datos obtenida para la formación de la matriz X

Longitud de onda de emisión de Cadmio (nm)	Límite inferior (nm)	Límite superior (nm)
214.44	214.3	214.7
226.55	226.4	226.7

La figura 9 (a) y (b) muestra respectivamente las líneas 214.44 nm y 226.55 nm normalizadas y con corrección de la línea base. Cada curva espectral es el promedio de tres muestras. En la tabla 6 se detallan los límites inferior y superior de dichas ventanas. Estas ventanas espectrales muestreadas, fueron concatenadas formando un arreglo de 33 puntos.

Figura 9.

Espectros totales en las líneas (a) 214,44 nm y (b) 226, 55 nm y área bajo la curva sombreada



5.3.3.2 Desarrollo del modelo PLS-1

El análisis cuantitativo multivariado para predecir la concentración de cadmio en muestras de cacao se desarrolló utilizando regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR), mediante el algoritmo (*SIMPLS*). La evaluación y determinación del número de componentes, se llevó a cabo por el método de validación cruzada de Monte Carlo. La forma de evaluar el desempeño de modelo fue el SEC, SECV, RER, RE. En la validación por Monte Carlo el 60 % de la muestra se utilizaron para entrenamiento y el 40 % se utilizó para la validación.

Una vez identificada el área bajo las curvas seleccionados se procede a la concatenación con las concentraciones encontradas por AAS, para ello se construyen las variables latentes que conformarán las 20 componentes elegidas para el diseño de este modelo.

Una vez elegido el número de componentes adecuado con esta agrupación se construye el modelo de regresión lineal de mínimos cuadrados, para ello se elige una partición de las agrupaciones de manera que el 60% de las muestras corresponde al modelo de calibración y el 40% corresponde al modelo de validaciones, para un total de 20 componentes elegidas en el modelo PLS-1 se eligen 1000 particiones y se determinan con ellos las métricas del desempeño.

6. Resultados y Análisis de resultados

6.1 Análisis cualitativo de cacao

En general se identificaron los mismos elementos en las muestras en forma de pastilla y la muestra producto del tratamiento Sólido-Líquido-Sólido (S-L-S). Para el caso de las muestras

analizadas tras el tratamiento S-L-S se encontró que estas exhiben líneas muy intensas de calcio, potasio, magnesio, sodio, y carbono, dichos resultados son semejantes a los hallados por (Bertoldi *et al.*, 2016), en cuyo trabajo identificó mediante ICP-MS que el elemento mayoritario era potasio. Sin embargo, debe anotarse que la cantidad de líneas que pueden identificarse por elemento y la intensidad de ellas, resultó menor en la presentación de las muestras en forma de pastilla debido al intenso efecto matriz. En la tabla 7 se pueden evidenciar los elementos mayoritarios encontrados en las muestras de cacao y en el Anexo 1 se pueden observar la totalidad de elementos identificados para ambos tratamientos.

Tabla 7.

Elementos mayoritarios encontrados en las muestras de cacao mediante LIBS para dos tratamientos de muestra

Elemento	Pastilla	Portamuestras de vidrio S-L-S-
Ca	✓	✓
P		✓
Mg	✓	✓
Ca	✓	✓
Fe	✓	✓
P	✓	✓
Si	✓	✓
Mn	✓	✓
Zn		✓
Ti		✓
Ba		✓

Na	✓	✓
K	✓	✓

6.2 Determinación de Cadmio por LIBS (Espectroscopía de plasma inducida por láser)

Muestras que con análisis F-AAS contenían Cadmio, mediante LIBS, en presentación de pastillas, no evidenciaron líneas de emisión en ninguna de las ventanas típicamente identificadas para la visualización de este elemento. Esto presumiblemente se debe a la complejidad con la que el Cadmio está presente en las pastillas de cacao, está ligado en forma de complejo coordinado a otros elementos (CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO^{3+} , CdCl^{2-} , CdCl^{3-} , CdCl_4^{2-} , Cd(OH)^{3-} , Cd(OH)_4^{2-} y quelatos orgánicos) (Castro *et al.*, 2015), dificultando su extracción mediante la energía del láser.

Otras posibles causas de la no detección de las líneas de emisión en las pastillas son la falta de homogeneidad de la muestra y su alto contenido graso que dificulta la compactación y por lo tanto se manifiesta un fuerte efecto matriz pese al proceso de maceración y prensado.

Además, elementos como el Hierro y el fósforo, pudieron solapar dichas líneas de emisión como es el caso de la ventana 214.44nm dónde se evidencian las líneas de emisión 213.54, 213.61 y 214.91 con intensidades de hasta 25000 u.a.

Para validar estas afirmaciones se contaminaron muestras de cacao de alta concentración identificada como C305 con 17 ppm de cadmio medidas por Absorción atómica, con una concentración adicional de 50 ppm de CdCl_2 y posterior liofilización para eliminar la humedad excedente, encontrando un aumento significativo de las líneas de emisión de cadmio 214.44 nm y 226.55 nm pero sólo para cacaos altamente concentrados entre 5 y 17 ppm, cacao con concentraciones por debajo de esta fue indetectable el cadmio. Por ello guiados por el trabajo

realizado por Yang *et al.*, 2019 para la determinación de cadmio en muestras de arroz, se procedió a implementar la metodología de transformación sólido – líquido – sólido (S-L-S) para las muestras de cacao.

La primera prueba consistió en trabajar con 1 gramo de C305, el que se trató con las condiciones estipuladas por Yang *et. al.*, encontrando que se visualizó claramente las líneas de emisión 214.44 nm, 226.5nm y 228.5nm, este aumento significativo de la intensidad podría atribuirse a la mejora en la homogeneidad de la superficie, además, el proceso principal del S-L-S, es la transformación del líquido en la fase sólida sobre un sustrato, lo que llevaría a un enriquecimiento de elementos de prueba y la reducción del umbral de ablación. Un detalle interesante observado en la figura 10 es que no se observa en esta ventana interferencia de elementos como el hierro, a diferencia de lo observado por Lin *et al.*, 2014, sin embargo se observa un aumento significativo en las líneas de emisión del fósforo (P), las cuales son evidentes en la pastilla pre y post tratamiento pero con intensidades menores.

La presencia del Fósforo puede ser atribuible a una de la fuentes más reconocidas del cadmio, las rocas fosfóricas (apatita) que componen muchos de los fertilizantes utilizados en cultivos, en dichas sustancias se pueden encontrar concentraciones de hasta 8 a 500 ppm de Cadmio (Bonomelli et al., 2003). El aumento en la intensidad de dichas líneas de emisión junto con la línea de cadmio 214.44 nm puede atribuirse al comportamiento químico de estos dos elementos, puesto que el fósforo puede formar presumiblemente complejos de hierro, aluminio y cloro a pH bajos, al igual que el cadmio. El hecho que no se encuentren interferencias significativas con el hierro y el aumento de las intensidades relativas de las líneas de Cd y P en la solución de

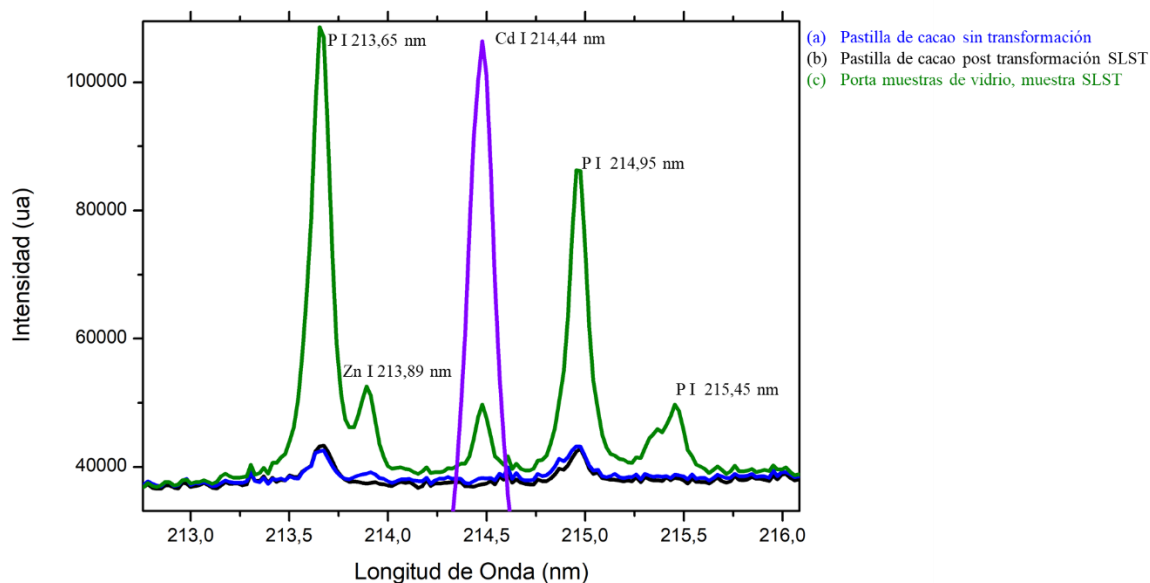
HCl, también podría atribuirse a la mayor tendencia de formación de sales solubles del Cd y el P, frente al Fe.

Adicionalmente se observa una línea de emisión de Zn, que no es detectable en las pastillas, pero sí en el portamuestras de vidrio, lo que sugiere que, al igual que el Cadmio, el Zinc se extrajo en su mayoría mediante el tratamiento, ver figura 10. Este fenómeno va de la mano con lo encontrado en la literatura, dado que el Zn es un elemento que siempre acompaña al Cd debido a su naturaleza química; presentan energías de ionización comparables (Primera energía de ionización 9.0 para Cd y 9.39 eV para Zn, segunda energía de ionización, 17.0 eV para Cd y 17.96 eV para Zn), además, se ha encontrado que la presencia de Zn incrementa la presencia de Cd intercambiable (Carrillo et Al., 2003).

Es evidente que mediante el proceso S-L-S se extrae el Cd^{2+} mediante la solución de HCl 0.1 N. El Cd forma sales solubles con el ión Cl, dado que no fue observado en pastillas elaboradas con el material sólido pos tratamiento SLS.

Figura 10.

Espectro de cacao en la ventana 214 nm (a) Pastilla de cacao sin transformación; (b) Pastilla de cacao post transformación (c) Porta muestras de vidrio, muestra SLST



Una vez corroborada la metodología que permite la detección de cadmio por medio de LIBS, se procedió a la identificación de parámetros instrumentales y experimentales que optimizaron la señal obtenida.

6.2.1 Estudio de parámetros de transformación S-L-S

En la tabla 8 se reportan los parámetros para los cuales se encontró la mayor área bajo la línea 214.44 nm y 226.55 nm.

Tabla 8.

Resultado del estudio de parámetros de optimización de tratamiento SLST

Tipo de parámetro	Parámetro	Valor
Experimental	Volumen de solución HCl 0.1 N adicionada	14 ml
	Tiempo de ultrasonido	15 min
	Número de capas	5
Instrumental	Tiempo de retardo	200 ns
	Número de disparos	200
	Distancia lente - muestra	18 cm

En la figura 11 (a-f), se muestra el comportamiento del área bajo las líneas espectrales 214.44 nm, 226.55 nm y 228.8 nm del Cadmio, en función de los distintos parámetros experimentales e instrumentales de LIBS. Tomando como criterio, el valor del parámetro que maximiza esta área, encontramos que el volumen de solución de HCl 0.1 N es 14 ml, figura 11 (a). Manteniendo constante este volumen de solución, el tiempo de ultrasonido que maximiza el área bajo las líneas espectrales resulta en 15 minutos. Por otro lado, el número de capas se estableció en cinco (5), a diferencia de los parámetros anteriores, se trata de una elección por conveniencia, dado que no es evidente, en ningún caso, un descenso en el área bajo la curva espectral, ver figura 11 (c).

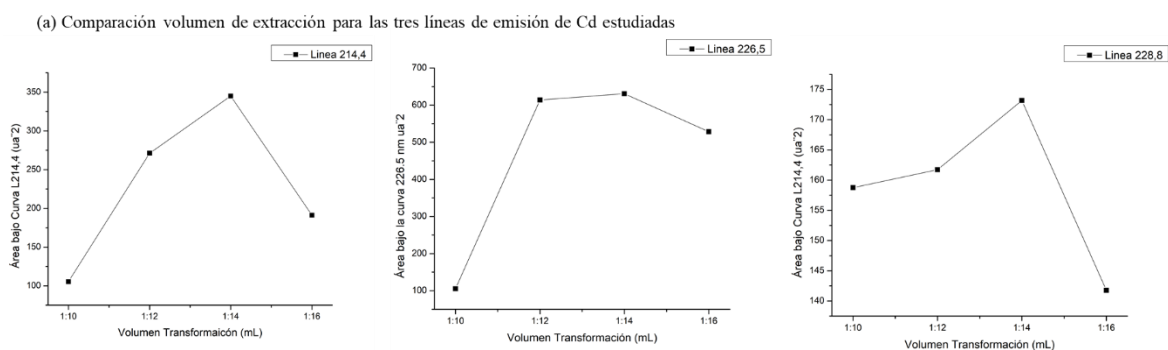
Respecto a los parámetros instrumentales, se puede observar en la figura 11 (d), que a medida que se reduce el tiempo de retardo, aumenta significativamente el área bajo la curva de las líneas 214.44 nm y 226.5 nm, si bien es cierto a medida que se disminuye el tiempo de retardo se

puede visualizar un ensanchamiento de las líneas de emisión, debido al efecto *Stark*. La intensidad relativa aumenta significativamente, para el caso del cambio 200 ns como tiempo de retardo permitieron, un aumento significativo de la intensidad de la señal y para el objetivo particular de ésta investigación, el ensanchamiento no introduce problemas adicionales ya que el posible solapamiento de otras especies no supone un problema puesto que el analito de interés es el cadmio. En la figura 11, se pueden observar este fenómeno para la línea 214.44 nm y 226.55 nm (Miziolek *et al.*, 2006, p.29).

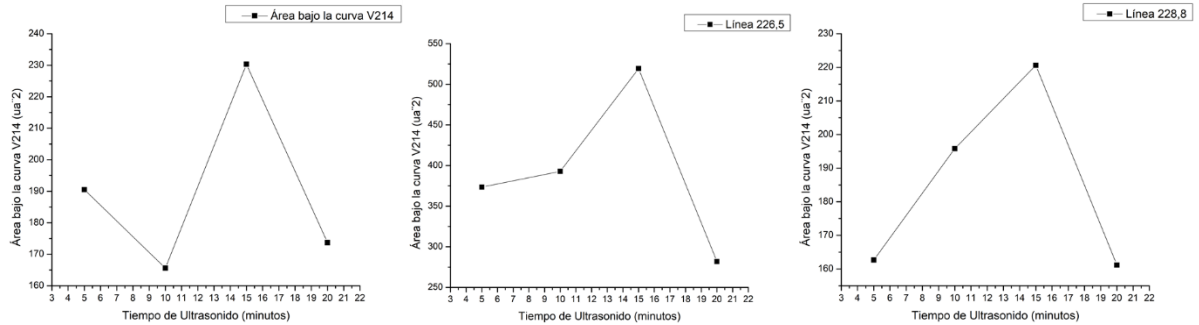
Finalmente, en la figura 11 (f) se puede observar que efectivamente a medida que aumenta el número de disparos, aumenta el área bajo la curva, por ello se eligió 200 disparos como un buen parámetro para la muestra de acuerdo a lo trabajado por diversos autores con la metodología SLST (Yang *et al.*, 2019; Yi *et al.*, 2018). De igual forma, en la figura 11 (e) Se puede observar que la mayor área bajo la curva se obtuvo para una distancia de 18 cm de la lente a la muestra

Figura 11.

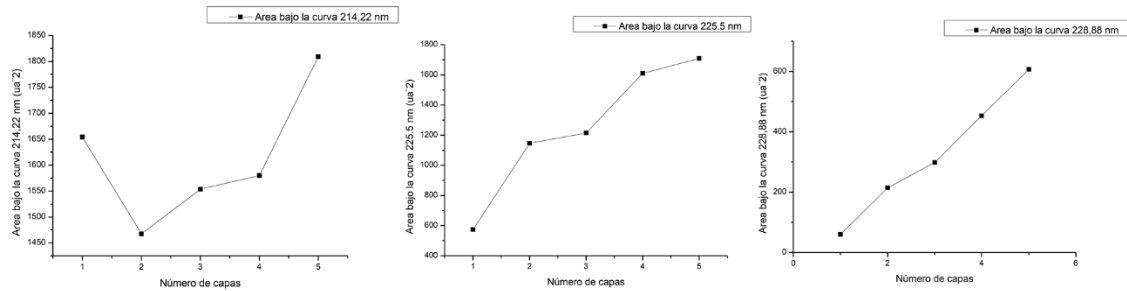
Análisis del estudio de parámetros experimentales e instrumentales del proceso de transformación S-L-S (a) Volumen de solución añadido; (b) Tiempo de ultrasonido; (c) Numero de capas (d) Tiempo de retardo; (e) Distancia lente muestra; (f) Número de disparos



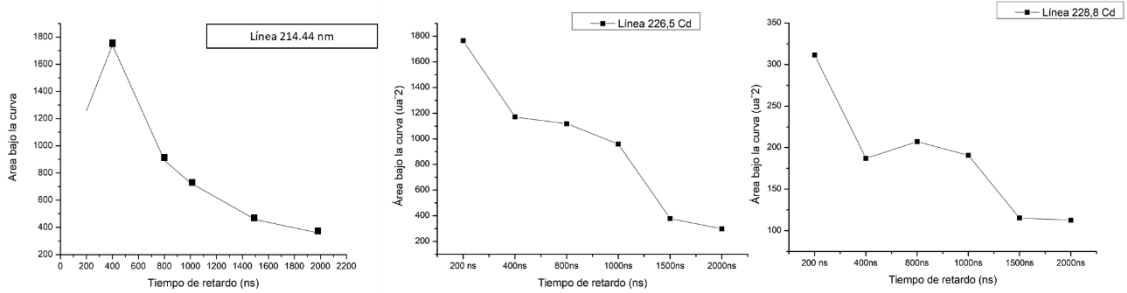
(b) Comparación tiempo de ultrasonido para las tres líneas de emisión de Cd estudiadas



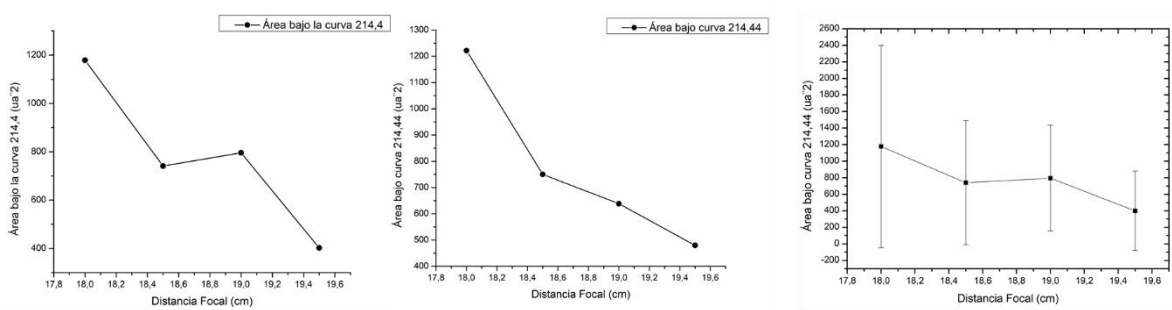
(c) Comparación número de capas para las tres líneas de emisión de Cd estudiadas



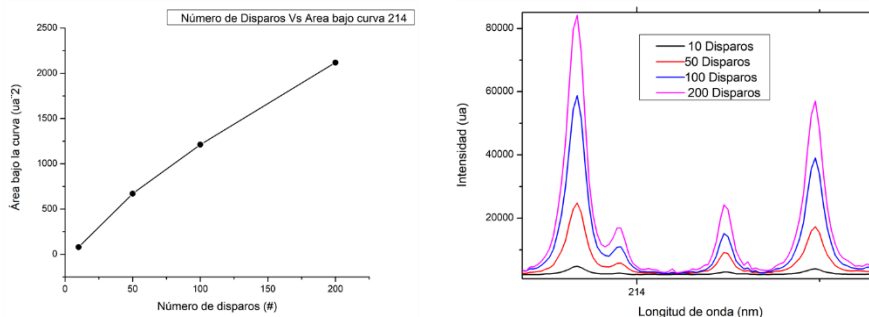
(d) Comparación tiempo de retardo para las tres líneas de emisión de Cd estudiadas



(e) Comparación distancia focal para la línea de emisión 214.44 nm de Cd I



(f) Comparación Número de disparos para la línea de emisión 214.44 nm de Cd I



Nota: Para los parámetros de (a) a (d) se analizó el área bajo la curva de las líneas 214.44 nm, 226.55 nm y 228.88 nm para una misma muestra; para el caso de del parámetro (e) distancia lente - muestra, se analizó el área bajo la curva para dos muestras en la línea 214.44 por ello se puede observar la gráfica con barras de desviación estándar; para el parámetro (f) número de disparos se analizó el aumento de la intensidad relativa y el área bajo la curva de la línea 214.44 nm al ser evidente el aumento de intensidad y con referencia a bibliografía se eligió 200 disparos como un buen parámetro.

6.3 Caracterización del plasma

6.3.1 Densidad electrónica:

La densidad electrónica del plasma se determinó mediante la ecuación (1). El FWHM (ancho a la altura media) de la línea H_{α} se estimó en 3.128 nm generando una densidad electrónica de $4.99 \times 10^{23} \text{ cm}^{-3}$.

6.3.2 Determinación de la temperatura del plasma:

Para la determinación de la temperatura del plasma en el porta muestras de vidrio se analizaron 4 líneas de emisión del Fe I en el intervalo de 370 – 390 nm, obtenidas en una misma ventana de inspección, permitiendo que la respuesta del detector y resolución de la rejilla de

observación sea constante, para ello se verificaron los parámetros reportados en la base de datos NIST los cuales se pueden observar en la tabla 9, y la figura 12 resultado de la aplicación de la ecuación de Boltzman donde es posible determinar la temperatura del plasma a partir de la pendiente.

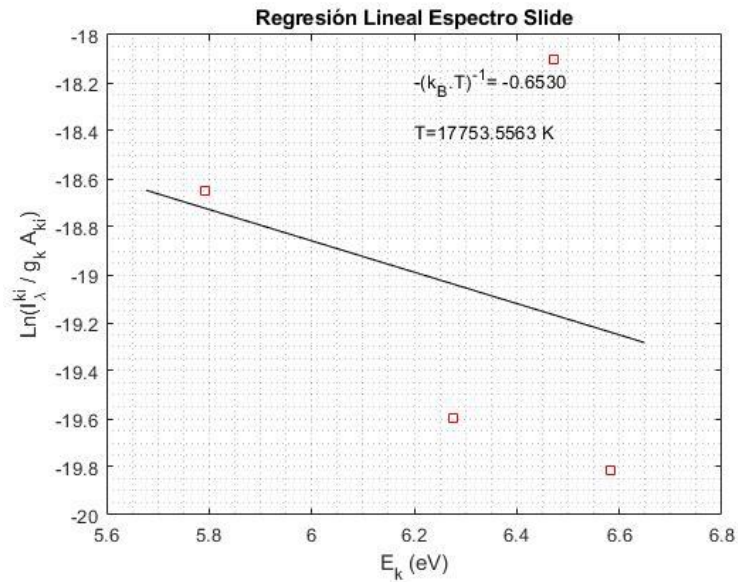
Tabla 9.

Parámetros espectroscópicos de las líneas de transición del Fe I utilizadas para el cálculo de la temperatura electrónica del plasma

λ	$g_k A_{ki}$	E_k (eV)
373.791	4.47×10^8	6.5827
383.278	4.21×10^7	5.7926
383.861	2.18×10^8	6.2753
386.296	1.31×10^7	6.4737

Figura 12.

Diagrama de Boltzmann de las líneas de hierro neutro observadas en el espectro LIBS de una muestra de cacao con tratamiento SLS



Por lo tanto, como se puede observar en la figura 12, la temperatura del plasma obtenido es de 17753.55 K, lo cual se fundamenta en la disminución del efecto matriz, el aumento del área de *spot* lo que permite disminuir el umbral de ablación, permitiendo temperaturas más elevadas. Para la densidad electrónica obtenida puede observarse que se cumple el criterio de McWhirter ($n \geq 1.6 * 10^{12} T^{\frac{1}{2}} (\Delta E)^2$ donde T es la temperatura electrónica y ΔE la diferencia de energía entre dos niveles adyacentes), luego se puede asumir que el plasma cumple el LTE (Equilibrio Termodinámico Local).

6.4 Análisis de muestras de cacao por absorción atómica

Experimentalmente las muestras de cacao demostraron una digestión incompleta, con remanente de grasa, cuando el procedimiento de adición de peróxido de hidrógeno se llevaba a

cabo inmediatamente después de la adición de HNO_3 ; sin embargo, al permitir una digestión preliminar en los recipientes de teflón por 48 horas, como lo sugirió Ferreira de Oliveira *et al.*, 2021, se logró una digestión completa incluyendo las fracciones de grasa, que en el cacao puede llegar hasta el 60%, por lo que se eligió este procedimiento, aun cuando requería mayor cantidad de tiempo. Los resultados de las concentraciones obtenidas para las muestras por Absorción atómica arrojaron un rango muy amplio de concentraciones partiendo desde 0 hasta 17 ppm, sin embargo, para el desarrollo del modelo de calibración sólo se utilizaron las muestras con concentraciones entre 0 y 1 ppm. Los resultados de las concentraciones de la totalidad de las muestras se pueden observar en el anexo 2 así como también se pueden observar con detalle los resultados tabulados para el porcentaje de recuperación (%Recuperación) que fue del 98%; una desviación estándar de 0.00199, límite de detección de 0,056 ppm calculado de la forma $LOD = X_{prom} + 3DS$, donde X_{prom} corresponde a la media de las concentraciones para los blancos y DS es la desviación estándar de estas mediciones, y un límite de cuantificación de 0.07 ppm calculado de la forma $LOQ = X_{prom} + 10DS$. Y un coeficiente de variación de 0.0398 calculado de la forma $CV = DS / X_{prom}$.

6.5 Construcción del modelo predictivo basado en PLS-1

El modelo se desarrolló a partir de 46 muestras con concentraciones entre 0 y 1 ppm. Dado que la técnica de validación cruzada fue Monte Carlo, esta población se dividió aleatoriamente en dos conjuntos: uno con 28 muestras para entrenamiento n_t y el otro con las 18 muestras restantes para validación n_{cv} . Se ensayaron un total de 1000 particiones (o pruebas) que generan sendos modelos para cada una de las primeras 20 variables latentes (LVs).

En todos los casos, el conjunto de entrenamiento contenía las muestras con los valores más altos y más bajos de concentración de cadmio (ver tabla 11). Por lo tanto, el modelo de regresión sólo es válido para interpolar valores en ese rango.

En la figura 13, se observa que después de algunas oscilaciones, la correlación de dos vectores \bar{b} consecutivos prácticamente permanece constante, lo que sugiere que se incorpora información nueva insignificante a partir de la octava (8) variable latente (LV). Apoyados en esto podemos definir la dimensión del modelo de regresión en el sentido de PLS-1.

Habitualmente el número de variables latentes del modelo se selecciona atendiendo a un mínimo en el comportamiento del SECV (figura 14) lo cual sugiere en este caso entre 10 y 14 variables. Este número de variables latentes exige una cantidad de muestras superior a las disponibles con el propósito de respetar el número de grados de libertad del modelo de calibración por ello se omitió este criterio

Para seleccionar la partición apropiada, con ocho variables latentes, se recurre al plano SECV-SEC. Cada modelo arrojado, con un \bar{b} y su respectivo término independiente, se ubica sobre segmentos de arco, permitiendo seleccionar la partición más próxima a la línea de identidad (diagonal) y cumpliendo con el criterio $SECV > SEC$, ver tabla 10, lo cual es una característica de los modelos moderadamente optimistas (es decir, aquellos modelos que evitan el sobreajuste), figura 15.

Figura 13.

Correlación de dos vectores b consecutivos contra el número de factores PLS

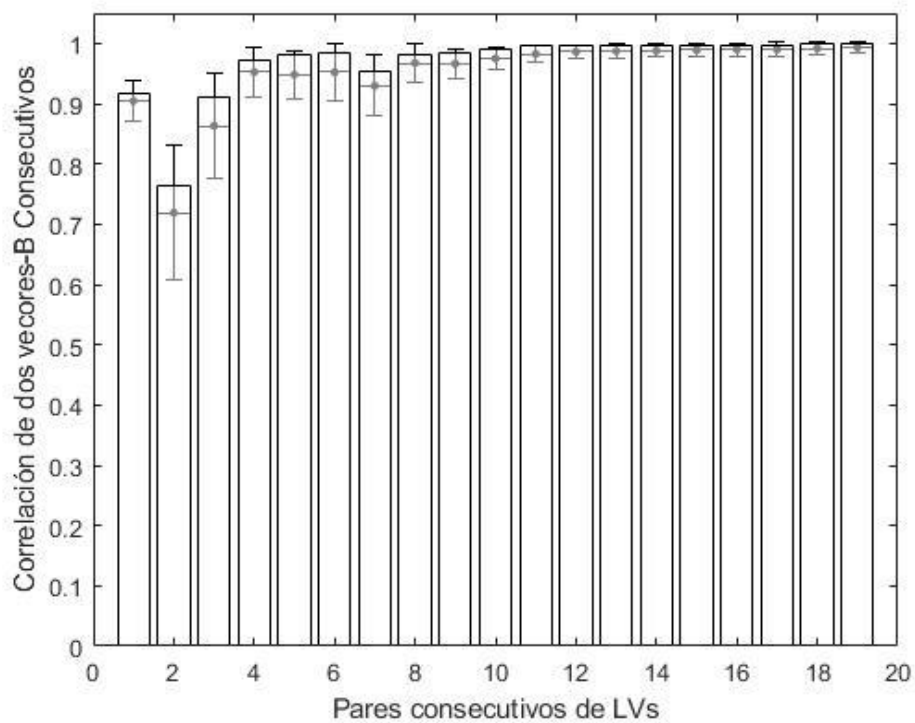
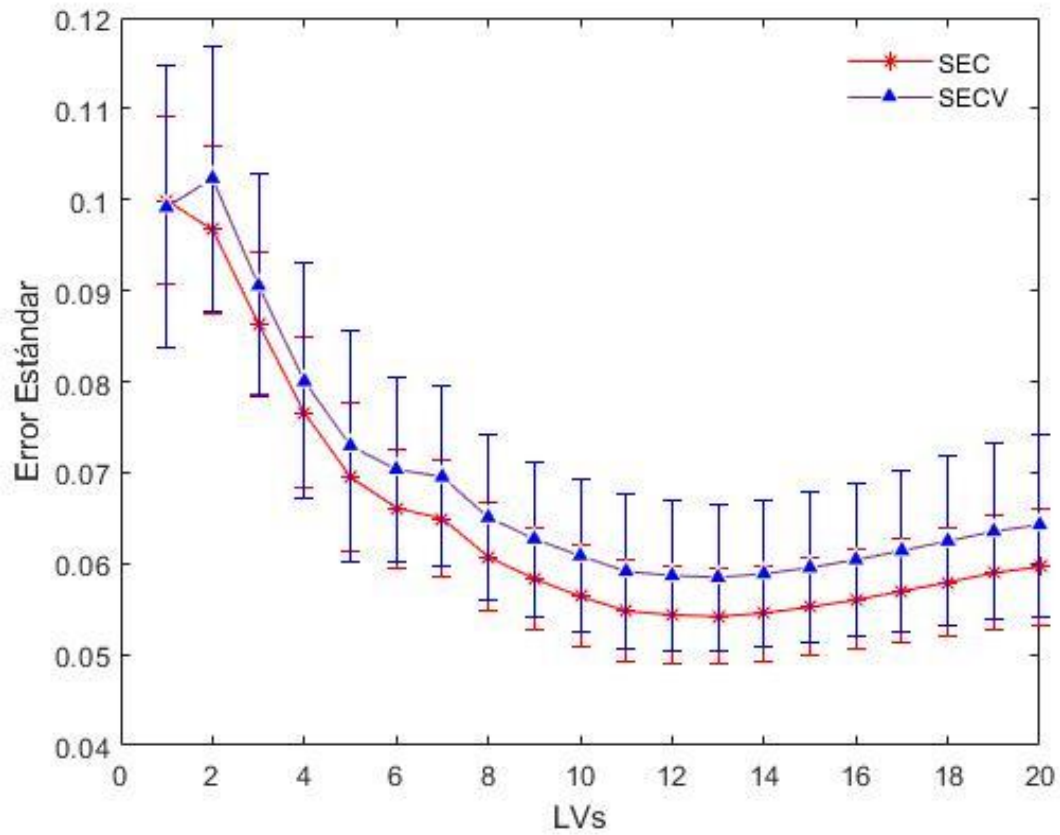


Figura 14.

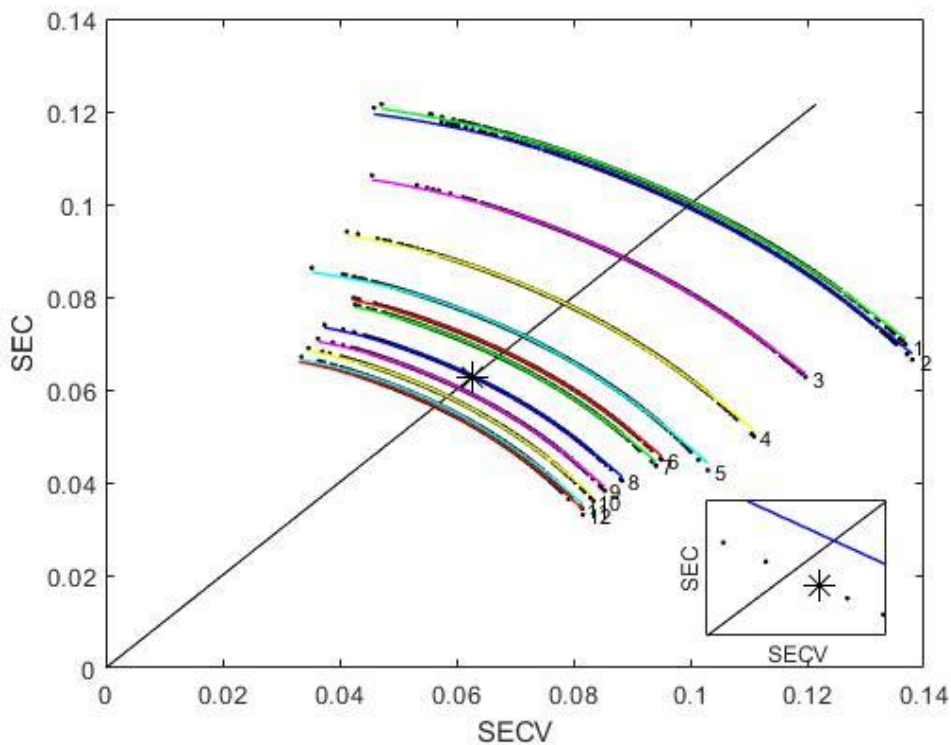
Error estándar de validación y error estándar de calibración



Los valores correspondientes a esta partición son SEC (0.05 ± 0.006), SECV (0.10 ± 0.0092) y son consistentes con el comportamiento de las concentraciones de cadmio predichas versus las concentraciones medidas.

Figura 15.

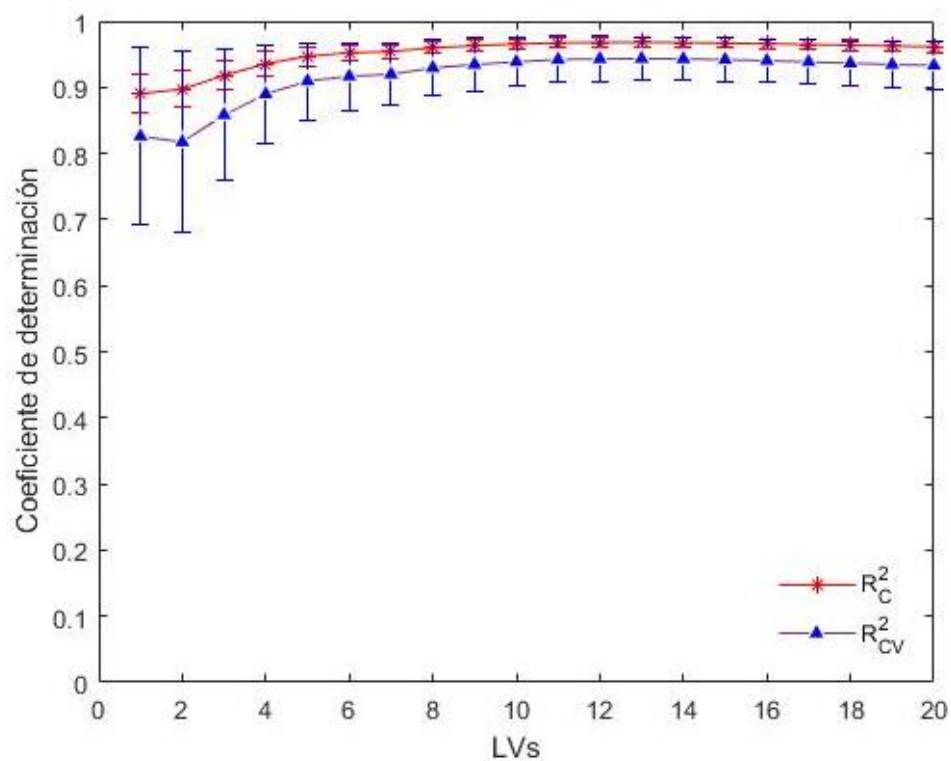
Errores estándar de 1000 particiones para cada uno de los primeros 12 LV utilizando el vector \bar{b} , en el plano SECV-SEC.

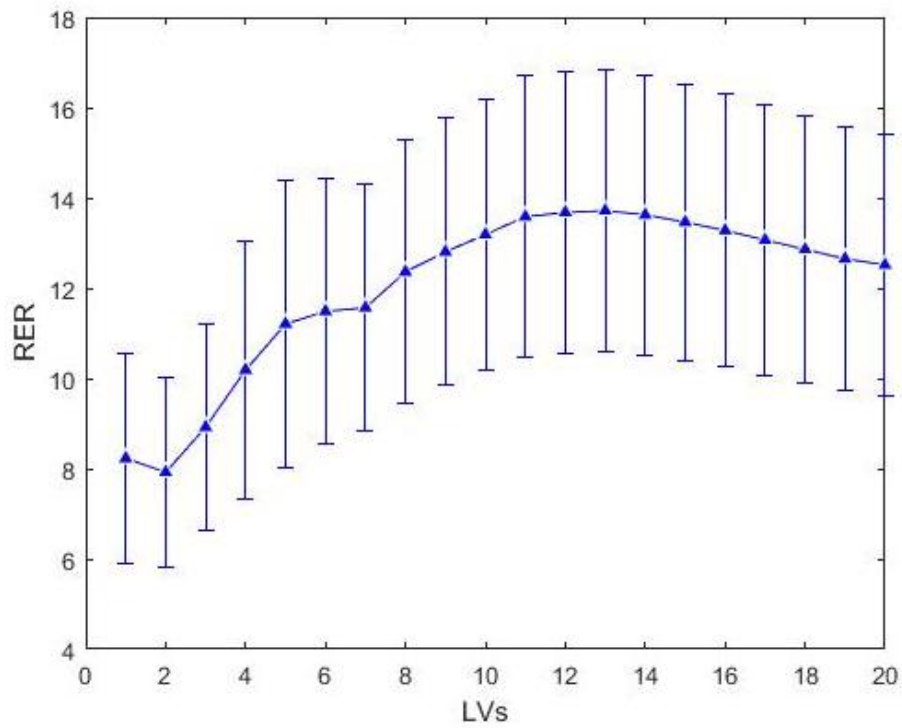


Nota: En el recuadro se hace una ampliación de la partición seleccionada (marcada con un asterisco) esta partición cumple la condición de $SECV > SEC$. Su cercanía a la línea de identidad demuestra un optimismo moderado.

Figura 16.

Métricas de rendimiento del modelo para predecir la concentración de cadmio en muestras de cacao VS el número de variables latentes (LV)





Nota: (a) Coeficiente de determinación para el conjunto de datos de entrenamiento R^2_C y validación R^2_{CV} ; (b) Evaluación del error de rango RER. Las barras verticales indican la desviación estándar del promedio de las 1000 particiones para cada LV.

Otras métricas para describir la calidad del modelo seleccionado fueron: Coeficiente De determinación de calibración R^2_C , Coeficiente de determinación de validación R^2_{CV} , Error de rango RER (Tabla 10), los valores encontrados para R^2_C (0.97 ± 0.0093) y R^2_{CV} (0.84 ± 0.00421), son típicos de los modelos de calibración multivariada.

RER tiene un valor de 8.98 ± 2.92 para la partición seleccionada, por lo tanto, el modelo propuesto en este proyecto de investigación puede considerarse aceptable para tamizaje,

Tabla 10. Descripción del rendimiento del modelo

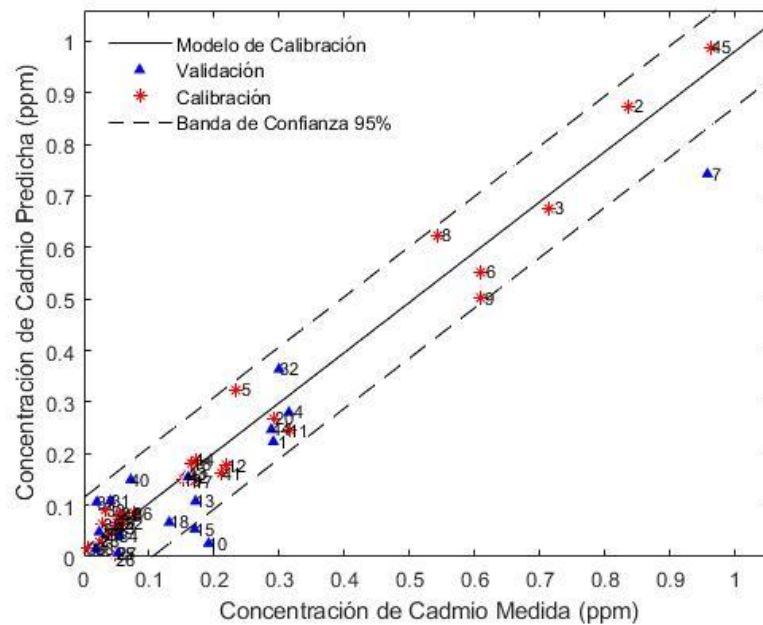
Parámetro	Valor
Concentración mínima	0.01
Concentración máxima	1.0
LVs	8
R²C	0.97 ± 0.009
R²CV	0.84 ± 0.004
RER	8.98 ± 2.92
SEC	0.05 ± 0.006
SECV	0.10 ± 0.0092
Fcal	105.20
Ftab	3.01
β1 p-valor	0.316
β2 p-valor	0.5012

El valor para F (bondad de ajuste o *goodness-off-fit*) fue de 105.20. Este valor constituye el F_{Cal} (F calculado) que debe compararse con el F_{Tab} (0.95, 7, 20), para n =28 y p=8, en este caso para un margen de confianza del 95%, De las tablas: F_{Tab} (0.95, 7, 20) =3.01.

Dado que F_{Cal}>F_{Tab}, se puede decir que el modelo es adecuado para ajustar los datos con el margen de confianza mencionado (Mattias, 2007, P. 191).

Figura 17.

Correlación entre los valores observados y los valores predichos (Valores de concentración de Cd)

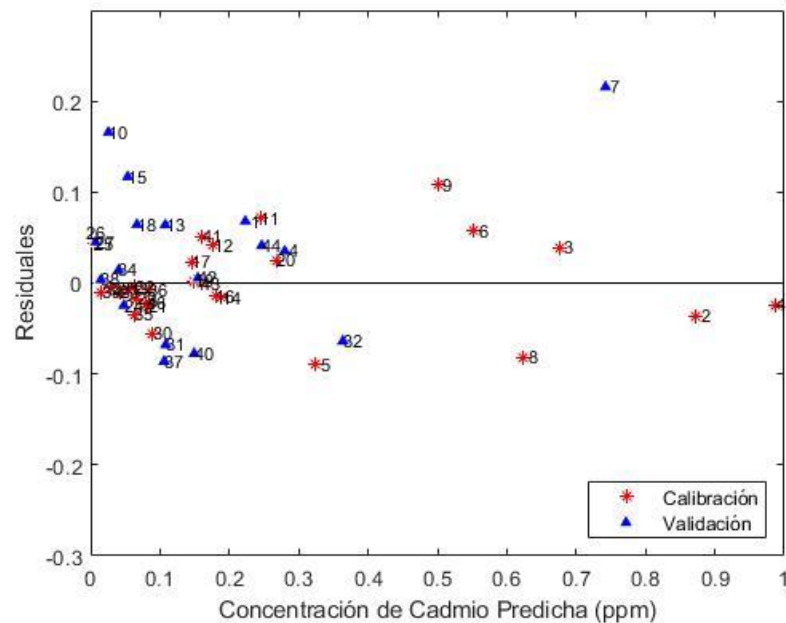


Nota: La predicción se realizó tomando el vector \bar{b} y una partición (seleccionada entre 1000 particiones correspondientes a la marcada con el asterisco en la gráfica (modelo).

La figura (17) muestra el desempeño del modelo de calibración propuesto, nótese que una pequeña fracción de las muestras queda por fuera de las bandas de confianza al 95% (líneas discontinuas).

Figura 18.

Residuales para la concentración de cadmio de predicción usando LIBS para las líneas de emisión 214.44 y 226.5 nm.

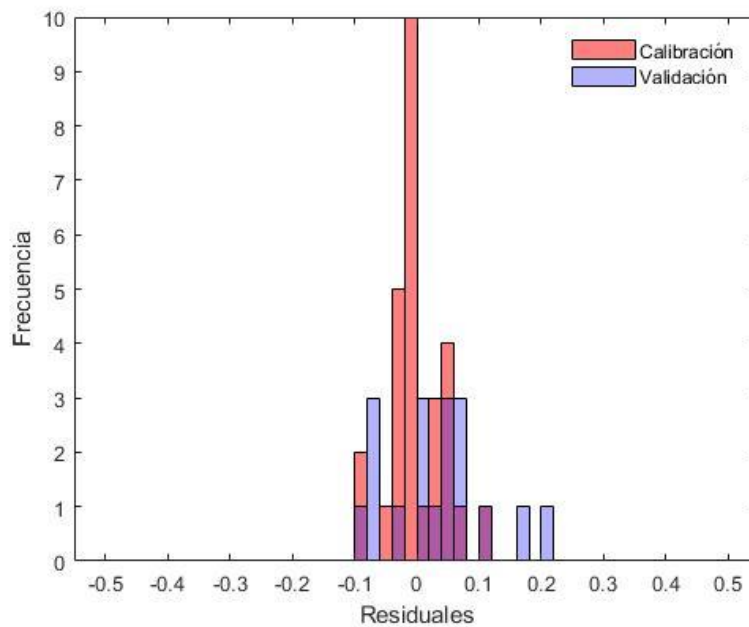


La figura (18) muestra un patrón aleatorio en los residuos en función de los valores de referencia. En particular, se observa una mayor aglomeración de los valores de validación y calibración cercanos al cero. Este patrón aleatorio se corrobora con la ausencia de tendencias lineales o cuadráticas. Para el modelo predictivo obtenido, el valor p correspondiente a la distribución de los coeficientes polinómicos β_1 y β_2 , es superior a 0.05, ver tabla 10. El número de permutaciones de valores de referencia de validación cruzada se fijó en 50000 (Filgueiras, 2014). Finalmente, otra forma de verificar el comportamiento de los residuales, corresponde a su histograma, ver figura 18. Este resultado se corrobora con el patrón aleatorio de los residuos de validación cuando se confrontan con sus respectivos valores de referencia (homocedasticidad),

véase la Fig. (18). El número de permutaciones de valores de referencia de validación cruzada se fijó en 50000 (Filgueiras, 2014).

Figura 19.

Histograma de los residuales para la predicción de la concentración de cadmio en cacao

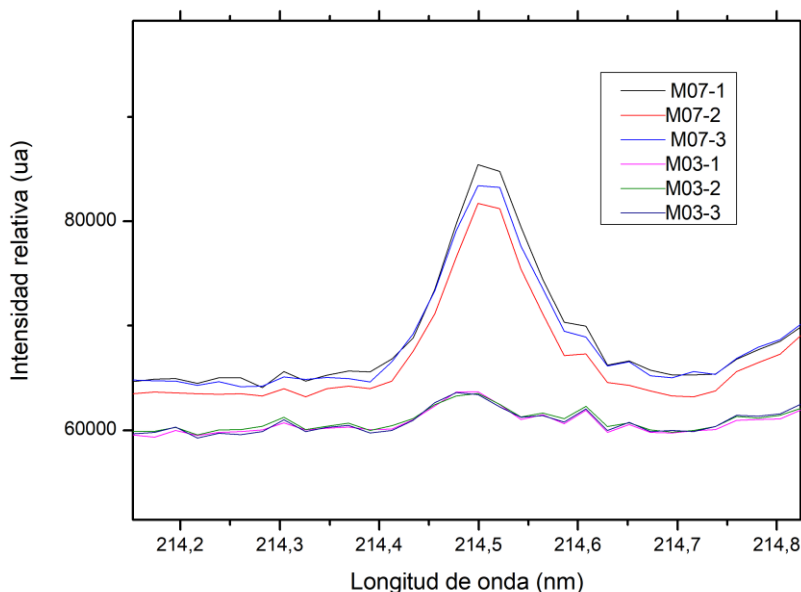


En la figura (17) se puede observar que La muestra M07 exhibe el mayor error, fuera de las bandas de confianza, lo cual se reitera en la figura (18), lo que representa un amplio error, al analizar detalladamente la relación de los resultados obtenidos en LIBS versus los resultados obtenidos por medio de absorción atómica y comparándola con una muestra con una concentración cercana como M03 medida por absorción atómica, se evidencia que no hay una correcta relación de las concentraciones y el área bajo la curva , como se puede observar en la figura (20) las intensidades relativas y áreas bajo la curva para la muestra M07 son casi el doble que para la muestra M03 aun cuando según absorción atómica la concentración de cadmio para M07 es de

0.61 ppm y la de M 03 es 0.72 ppm por lo tanto no guarda relación con los datos obtenidos, es por ello que el residual de predicción fue tan elevado, sin embargo esta muestra hace parte del grupo de validación lo cual no afecta el ajuste del modelo.

Figura 20.

Comparación espectros LIBS muestras M07 y M08



7. Conclusiones

La metodologías diseñada y desarrollada en este trabajo de investigación permitieron obtener un modelo PLS mediante el cual es posible predecir la concentración de cadmio en muestras de cacao con una exactitud atribuible a un modelo de tamizaje, el cual se elaboró con 46

muestras, puesto que originalmente se tenía 68 muestras, pero el modelo funciono adecuadamente solo para concentraciones entre 0 y 1 ppm, debido a que no existía una distribución uniforme para concentraciones superiores.

Los resultados obtenidos evidencian una buena correlación entre los datos predichos y los medidos, con un R^2 de 0.97 además de un valor de SECV mayor que SEC para 8 variables latentes elegidas a través del método de validación cruzada de Monte Carlo, lo que indica un buen ajuste del modelo.

Es posible implementar la metodología de transformación SLS para el análisis de muestras pro medio de LIBS la cual mejora significativamente la razón señal/ruido del espectro permitiendo desarrollar este modelo predictivo con relativa sencillez experimental y pocos reactivos químicos comparados con otras metodologías cómo ICP-OES, disminuyendo costos y tiempo de análisis.

Es posible realizar el análisis cualitativo de muestras de cacao mediante LIBS ya sea con muestras en forma de pastilla prensada o muestras producto del proceso de transformación SLS.

8. Recomendaciones

Para futuros proyectos sería interesante utilizar técnicas más robustas como ICP-OES como fuente de determinación de concentración de cadmio, así como un mayor número de muestras y con un amplio rango de concentraciones, que permita elaborar una estadística más completa que permita una mejor exactitud en la predicción de la concentración de cadmio.

Referencias Bibliográficas

Alciaturi, C. E., Escobar, M. E., De La Cruz, C., & Rincón, C. (2003).
[Http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-07702003000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-07702003000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es). *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 26(3), 197-204.

ANTEPROYECTO DE NIVELES MÁXIMOS PARA EL CADMIO EN EL CHOCOLATE Y PRODUCTOS FAO.pdf. (s. f.).

Año cacaotero 2020-2021, el de mayor producción de cacao en la historia de Colombia. (s. f.). Sitefedecacao. Recuperado 24 de noviembre de 2021, de <https://www.fedecacao.com.co/post/año-cacaotero-2020-2021-el-de-mayor-producción-de-cacao-en-la-historia-de-colombia>

AOAC OFFICIAL METHOD Cd MICROWAVE DIGESTION.pdf. (s. f.).

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. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>

Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., & Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of Theobroma cacao beans and cocoa products. *Food Control*, 65, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013>

Bonomelli, C., Bonilla, C., & Valenzuela, A. (2003). Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(10), 1179-1186. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003001000007>

Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., & Rodríguez, E. A. G. (2021). The First National Survey of Cadmium in Cacao Farm Soil in Colombia. *Agronomy*, 11(4), 761. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040761>

Bravo, D., León-Moreno, C., Quiroga, R., Moreno, E., Duarte, D., Zamora, A., Gutiérrez, E., Aristizábal, A., Arroyave, C., Cardona, L., Guerra, B., Olarte, H., Cuervo, C., & Orozco, M. L. (2021). *¿Qué es el cadmio y por qué es importante en el cultivo de cacao? (Primera)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia). <https://doi.org/10.21930/agrosavia.nbook.7404548>

Cadmio_cacao_fao_codex_CL2017.pdf. (s. f.).

Cadmium dietary exposure in the European population. (s. f.). *EFSA Journal*, 2012;10(1):2551. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551>

Carrillo-González, R., & Cruz-Díaz, J. (s. f.). *INTERACCIÓN Zn-Cd EN EL SUELO Y MAÍZ*. 11.

Castro, A. V., de Almeida, A.-A. F., Pirovani, C. P., Reis, G. S. M., Almeida, N. M., & Mangabeira, P. A. O. (2015). Morphological, biochemical, molecular and ultrastructural changes induced by Cd toxicity in seedlings of *Theobroma cacao* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 174-186. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.003>

Celis, S. L. H. (2012). *ANÁLISIS CUALITATIVO Y SEMI-CUANTITATIVO DE MICROFÓSILES PROVENIENTES DEL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE μ -PLASMA INDUCIDA POR LÁSER (μ -LIBS)*. 71.

Codex_140419.pdf. (s. f.).

E13 Committee. (s. f.-a). *Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis*. ASTM International. <https://doi.org/10.1520/E1655-17>

E13 Committee. (s. f.-b). *Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis*. ASTM International. <https://doi.org/10.1520/E1655-17>

Estrada, S. A. A. (2017). *Determinación de la Concentración Elemental del Plasma de Aire Atmosférico Producido por la Técnica Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*. 72.

Estupiñán, H., Peña, D. Y., García, Y. O., Cabanzo, R., & Mejía-Ospino, E. (2009). Stoichiometry analysis of titanium oxide coating by LIBS. *The European Physical Journal D*, 53(1), 69-73. <https://doi.org/10.1140/epjd/e2009-00030-0>

Ferreira de Oliveira, A. P., Milani, R. F., Efraim, P., Morgano, M. A., & Tfouni, S. A. V. (2021). Cd and Pb in cocoa beans: Occurrence and effects of chocolate processing. *Food Control*, 119, 107455. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107455>

Filgueiras, P. R. (2014). Evaluation of trends in residuals of multivariate calibration models by permutation test. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 9.

Gonzalez, Y. A. C. (2005). *VALIDACIÓN INTERNA DEL METODO "DETERMINACIÓN DE HIERRO POR ABSORCIÓN ATÓMICA EN HARINA DE TRIGO FORTIFICADA"*. 80.

Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Chincheros Paniagua, J., Armengot, L., Schneider, M., & Schulin, R. (2017). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture

systems under conventional and organic management. *Science of The Total Environment*, 580, 677-686. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014>

Järup, L., & Åkesson, A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.04.020>

Kobayashi, E., Suwazono, Y., Dochi, M., Honda, R., & Kido, T. (2009). Influence of Consumption of Cadmium-Polluted Rice or Jinzu River Water on Occurrence of Renal Tubular Dysfunction and/or Itai-itai Disease. *Biological Trace Element Research*, 127(3), 257-268. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8239-z>

Lin, H., Mingyin, Y., Jinlong, L., Muhua, L., & Xiuwen, H. (2014). Determination of Cadmium in Gannan Navel Orange using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Coupled with Partial Least Squares Calibration Model. *Journal of Applied Spectroscopy*, 80(6), 957-961. <https://doi.org/10.1007/s10812-014-9873-1>

Lo que debe saber para exportar cacao fino de aroma. (2017, marzo 28). <https://procolombia.co/actualidad-internacional/agroindustria/lo-que-debe-saber-para-exportar-cacao-fino-de-aroma>

Markiewicz-Keszycka, M., Cama-Moncunill, X., Casado-Gavaldà, M. P., Dixit, Y., Cama-Moncunill, R., Cullen, P. J., & Sullivan, C. (2017). Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 65, 80-93. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.005>

Martínez, D. C. P. (2010). *DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA C:H:O EN ASFALTENOS COLOMBIANOS MEDIANTE LA TÉCNICA ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDA POR LASER (LIBS)*. 81.

Minagricultura anuncia plan de renovación de diez mil hectáreas de cacao en 2021 para mejorar la productividad. (s. f.). Recuperado 24 de noviembre de 2021, de <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Minagricultura-anuncia-plan-de-renovaci%C3%B3n-de-diez-mil-hect%C3%A1reas-de-cacao-en-2021-para-mejorar-la-productividad.aspx>

Miziolek, A. W., Palleschi, V., & Schechter, I. (s. f.). *LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS): Fundamentals and Applications*. 640.

Mrmošanin, J. M., Pavlović, A. N., Krstić, J. N., Mitić, S. S., Tošić, S. B., Stojković, M. B., Micić, R. J., & Đorđević, M. S. (2018). Multielemental quantification in dark chocolate by ICP OES. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.008>

Osorio, L. M. (s. f.). *Descubriendo la materia mediante luz láser*. 129.

Petrova, N. I., Lundovskaya, O. V., & Saprykin, A. I. (2016). Analysis of high-purity cadmium and cadmium dioxide by atomic absorption spectrometry. *Inorganic Materials*, 52(10), 1020-1024. <https://doi.org/10.1134/S0020168516100113>

Preocupaciones comerciales específicas—Sistema de Gestión de la Información Sanitaria y Fitosanitaria. (s. f.). Recuperado 26 de noviembre de 2021, de <http://spsims.wto.org/es/SpecificTradeConcerns/View/325>

Procolombia. (2021, agosto 5). *El cacao colombiano busca nuevas oportunidades en la región Measa*. Sala de Prensa | PROCOLOMBIA. <https://procolombia.co/noticias/el-cacao-colombiano-busca-nuevas-oportunidades-en-la-region-measa>

PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE CADMIO EN PRODUCTOS DERIVADOS DEL CACAO (LICOR DE CACAO, CHOCOLATE DE MESA, COCOA EN POLVO Y CHOCOLATINA DE LECHE). (s. f.).

Rondon, S. (s. f.). *DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS CADMIO Y PLOMO EN SUELOS Y GRANOS DE CACAO FRESCOS Y FERMENTADOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA*. 98.

Santos, D., Nunes, L. C., Trevizan, L. C., Godoi, Q., Leme, F. O., Braga, J. W. B., & Krug, F. J. (2009). Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for cadmium determination in soils. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 64(10), 1073-1078. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2009.07.030>

Satarug, S., Vesey, D. A., & Gobe, G. C. (2017). Health Risk Assessment of Dietary Cadmium Intake: Do Current Guidelines Indicate How Much is Safe? *Environmental Health Perspectives*, 125(3), 284-288. <https://doi.org/10.1289/EHP108>

Schwartz, G. G., Il'yasova, D., & Ivanova, A. (2003). Urinary Cadmium, Impaired Fasting Glucose, and Diabetes in the NHANES III. *Diabetes Care*, 26(2), 468-470. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.2.468>

Senesi, G. S., Cabral, J., Menegatti, C. R., Marangoni, B., & Nicolodelli, G. (2019). Recent advances and future trends in LIBS applications to agricultural materials and their food derivatives: An overview of developments in the last decade (2010–2019). Part II. Crop plants and their food

derivatives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 453-469.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.052>

Sezer, B., Bilge, G., & Boyaci, I. H. (2017). Capabilities and limitations of LIBS in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 345-353.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.003>

Skoog, D. A., Crouch, S. R., & De la Mora Lugo, E., Holler, F. James, Lanto Arriola, Mar??a Aurora, West, Donald M. (2015). *Fundamentos de qu??mica anal??tica*. <http://www.ebooks7-24.com/?il=798>

Superficie Sembrada por hect?reas con cultivos permanentes en el departamento del Valle del Cauca | Datos Abiertos Colombia. (s. f.). la plataforma de datos abiertos del gobierno colombiano. Recuperado 24 de noviembre de 2021, de <https://www.datos.gov.co/Agricultura-y-Desarrollo-Rural/Superficie-Sembrada-por-hect-reas-con-cultivos-per/v4ub-9eme>

Thakur, S. N., & Singh, J. P. (Eds.). (2007). *Laser-induced breakdown spectroscopy* (1st ed). Elsevier.

Tiempo, C. E. E. (s. f.). *Colombia registr? la mayor producci?n de cacao de la historia*. Portafolio.co. Recuperado 24 de noviembre de 2021, de <https://www.portafolio.co/economia/colombia-registro-la-mayor-produccion-de-cacao-de-la-historia-558190>

Tognoni, E., Cristoforetti, G., Legnaioli, S., & Palleschi, V. (2010). Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: State of the art. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 65(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2009.11.006>

Vanderschueren, R., De Mesmaeker, V., Mounicou, S., Isaure, M.-P., Doelsch, E., Montalvo, D., Delcour, J. A., Chavez, E., & Smolders, E. (2020). The impact of fermentation on the distribution of cadmium in cacao beans. *Food Research International*, 127, 108743. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108743>

Visor Digitalia. (s. f.). Recuperado 24 de diciembre de 2021, de <https://bibliotecavirtual.uis.edu.co:3806/visor/35152>

Yang, P., Zhou, R., Zhang, W., Yi, R., Tang, S., Guo, L., Hao, Z., Li, X., Lu, Y., & Zeng, X. (2019). High-sensitivity determination of cadmium and lead in rice using laser-induced breakdown spectroscopy. *Food Chemistry*, 272, 323-328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.214>

Yang, P., Zhu, Y., Yang, X., Li, J., Tang, S., Hao, Z., Guo, L., Li, X., Zeng, X., & Lu, Y. (2018). Evaluation of sample preparation methods for rice geographic origin classification using laser-induced breakdown spectroscopy. *Journal of Cereal Science*, 80, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.01.007>

Zarcinas, B. A., Ishak, C. F., McLaughlin, M. J., & Cozens, G. (s. f.). *Heavy metals in soils and crops in southeast Asia. 1. Peninsular Malaysia*. 15.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN CACAO MEDIANTE

LIBS, AAS Y MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.

92

Anexo 1. Análisis elemental de pastillas y portamuestras de vidrio de cacao

Especie	λ reportada por la NITS [nm]	λ Portamuestras de vidrio (nm)	λ Pastilla (nm)	Especie	λ reportada por la NITS [nm]	λ Portamuestras de vidrio (nm)	λ Pastilla (nm)
C I	193.09	193.13	193.07	K	766, 48991	766, 59	766,51
	422.67	422.69	422.65		769, 89645	769, 91	769,93
Ca I	430.25	430.27	430.23	Fe I	247,97		247,89
	442.54	442.56			247,97	247, 94	247, 93
	443.49	443.49	443.53		248,42		248,48
	45.47	445.47	445.55		293,69	293, 69	
	443.56	443.52	443.49	234,4	234, 36		
	445.58	445.50	445.47	Fe II	238, 22	238, 20	
	534.94	535.00			238,86	238,87	238,87
	558.87	558.92	558.45		250,79	25,077	250,75
	559.01	559.11	559.05		247.94	247.94	358,16
	559.01	559.48	559.56	358,11	358,16		
	559.84	559.89	559.87	Cr I	428.97	428.96	428.97
	610.27	610.27			526.41	526.32	526.32
	612.22	612.24	612.23	Mg II	279.07	279.138	
	Ca II	315,86	315.89			279.55	279.59
315, 88		315.90	315.91		279.79	279.84	279.91
317,93		317.95	318.00		280.27	280.32	280.39
370, 60		370.63	370.68		448.13	448.13	
373, 69		373.73	373.76	Na I	588.99	588.97	588.99
393, 36	393.29	393.35	589.59		588.58	589.64	
396,84	396.79		PI	213.61	213.64	213.64	
393,36	393.36			214.91	214.92	214.9	
396,84	396.84	396.82		215.29	215.026		
277.67	277.72			255.39	255.33	255.35	
277.98	278.02	278.04	Ni II	255.32	255.5		
Mg I	285.2	285.26		285.21	218.04		218.04
	382.93	383.01			218.504		218.51
	383.23	383.28			219.17		219.2
	383.82	383.86		383.86	220.01		220.08
	516.73	516.82			220.6		220.6
	517.26	517.82			221.17		221.17
	518.36	5183.60			221.64		221.64

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN CACAO MEDIANTE

LIBS, AAS Y MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.

93

Si I	198.36	198.32			231.09		
	198.63	198.65	198.70		232.00		
	198.89	198.91			300.24		300.22
	205.81	205.85	205.76		341.47		341.47
		207.31	207.36		352.45		352.42
	220.79	220.71		Ti II	323.45	323.47	
	221.08				323.65	323.66	323.69
	221.17	221.24			323.9	323.92	323.91
	221.66	221.77			334.9	334.92	334.89
	221.8	221.91			336.12	336.61	
	250.68				337.28	337.26	
	251.43	251.53		Zn II	206.2	206,271	
	251.61	251.70			213.85	213.86	
	251.92	252.01			328.23	328.23	
	252.41	252.51			330.25	330.27	
	252.85	252.93			334.5	334.48	
	263.12	263.13			481.05	481.1	
	288.15	288.17					

Especie	λ reportada por la NITS [nm]	λ Portamuestras de vidrio (nm)	λ Pastilla (nm)
MnII	257.61	257.62	
	259.37	259.37	
	260.56	260.58	
	262.56	262.57	262.57

Anexo 2. Concentraciones determinadas por medio de Absorción atómica con llama F-AAS

IDENTIFICACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN
M01	0.28	M17	0.17
M01	0.29	M17	0.17
M01	0.30	M18	7.43
M02	0.80	M18	7.34
M02	0.81	M18	7.15
M02	0.91	M19	0.17
M03	0.72	M19	0.16
M03	0.75	M19	0.18
M03	0.68	M20	4.88
M04	0.32	M20	5.70
M04	0.32	M20	5.66
M04	0.31	M21	0.16
M05	0.21	M21	0.16
M05	0.23	M21	0.17
M05	0.26	M22	0.14
M06	1.08	M22	0.19
M06	1.01	M22	0.18
M06	1.02	M23	0.13
M07	0.66	M23	0.12
M07	0.59	M23	0.14
M07	0.58	M24	0.16
M08	0.96	M24	0.15
M08	0.96	M24	0.14
M08	0.96	M25	15.50
M09	0.53	M25	15.91
M09	0.54	M25	17.29
M09	0.55	M26	0.28
M10	0.62	M26	0.30
M10	0.63	M26	0.30
M10	0.57	M27	10.68
M11	0.19	M27	9.20
M11	0.18	M27	11.30
M11	0.20	M28	4.33
M12	0.31	M28	4.48
M12	0.31	M28	4.21

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN CACAO MEDIANTE

LIBS, AAS Y MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.

95

M12	0.33	M29	0.06
M13	10.28	M29	0.05
M13	10.43	M29	0.05
M13	10.37	M30	0.05
M14	0.21	M30	0.06
M14	0.21	M30	0.07
M14	0.23	M31	0.04
M15	5.07	M31	0.03
M15	5.30	M31	0.03
M15	4.59	M32	0.02
M16	0.21	M32	0.02
M16	0.18	M32	0.03
M16	0.13	M33	0.03
M17	0.18	M33	0.05
M33	0.06	M50	0.09
M34	0.04	M50	0.06
M34	0.05	M50	0.07
M34	0.06	M51	-0.07
M35	-0.09	M51	-0.13
M35	-0.07	M51	-0.08
M35	-0.05	M52	0.01
M36	-0.01	M52	0.00
M36	-0.03	M52	-0.01
M36	-0.02	M53	-0.01
M37	0.06	M53	-0.02
M37	0.05	M53	0.00
M37	0.05	M54	-0.05
M38	0.03	M54	-0.05
M38	0.03	M54	-0.07
M38	0.01	M55	0.01
M39	0.05	M55	0.03
M39	0.05	M55	0.02
M39	0.05	M56	0.02
M40	0.04	M56	0.01
M40	0.03	M56	0.02
M40	0.03	M57	0.00
M41	0.05	M57	0.02
M41	0.05	M57	0.00

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN CACAO MEDIANTE

LIBS, AAS Y MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.

96

M41	0.03	M58	0.07
M42	0.28	M58	0.07
M42	0.32	M58	0.08
M42	0.30	M59	0.21
M43	1.29	M59	0.21
M43	1.34	M59	0.22
M43	1.28	M60	0.17
M44	0.05	M60	0.14
M44	0.06	M60	0.17
M44	0.03	M61	0.16
M45	-0.02	M61	0.15
M45	-0.01	M61	0.16
M45	-0.02	M62	0.29
M46	0.00	M62	0.29
M46	-0.03	M62	0.28
M46	-0.02	M63	3.30
M47	0.05	M63	3.12
M47	0.06	M63	2.75
M47	0.05	M64	0.94
M48	0.04	M64	1.11
M48	0.03	M64	0.84
M48	0.02	M65	0.04
M49	-0.05	M65	0.07
M49	-0.03	M65	0.07
M49	-0.04		