

**DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS CADMIO Y PLOMO EN SUELOS Y  
GRANOS DE CACAO FRESCOS Y FERMENTADOS MEDIANTE  
ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA.**

**GENNY ROCÍO MARTÍNEZ  
CAROLINA PALACIO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

**DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS CADMIO Y PLOMO EN SUELOS Y  
GRANOS DE CACAO FRESCOS Y FERMENTADOS, MEDIANTE  
ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA.**

**GENNY ROCÍO MARTÍNEZ**

**CAROLINA PALACIO**

**Trabajo de grado para optar el título de: Química**

**Directora:**

**MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA**

**Química, Ph. D.**

**Co-Director:**

**CRISTIAN BLANCO TIRADO**

**Químico, Ph. D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2010**

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darme sabiduría, paciencia y tolerancia en momentos difíciles durante mi vida universitaria.

A mi hijo GERMAN DAVID por ser la inspiración en mi vida.

A mi familia, mi mamá Margarita, mis hermanas Margarita y Monica y mis sobrinos Andres, Juanito y Daniel.

Al Hombre que me robo el corazón, por su amor, comprensión.

A mi amiga GENNY por su cariño, solidaridad y ayuda en tantas situaciones difíciles.

A la tropa: Nan, Ricardo, Luis, Migue, Sergio, Loraine, Johansson y Eduwin, son lo mejor que me ha dejado la U.

A mis amigas: Martha la O, Adriana, Carolina Patiño, ustedes siempre han estado en momentos difíciles.

A la señora Inés por su solidaridad. A Doña Gladys por ayudarme tantas veces con mi hijo.

A los directores del Proyecto Marianny Combariza y Cristian Blanco que me dieron la oportunidad de trabajar en un proyecto tan bello y con gente maravillosa.

Al Laboratorio Químico de Consultas de la Universidad Industrial de Santander y a su Directora Yolanda Vargas por su colaboración.

A Javier Moreno por su asesoría en el proyecto y su amistad.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre DIOS por su amor, por brindarme este bello presente y por permitirme finalizar este objetivo que fije dentro de mi proyecto de vida. Y a todos las personas que a puesto en mi camino para mi crecimiento y aprendizaje personal.

Agradezco a mi familia, mi mamá Inés y mi hermano Joaquín por su compañía en este proceso de estudio universitario. En especial a mi mamá por su colaboración en el financiamiento de mis estudios. A mi tía Delia María por mi crianza y en especial por enseñarme a creer en mí y a jamás dejar de soñar, porque cuando a estos se les ama con intensidad se vuelven realidad. A todos mis primos y tíos que siempre me colaboraron en mis estudios de primaria y secundaria. A todos los seres que amo quienes me brindaron su cariño, compañía y ayuda gracias.

A mi compañera de proyecto Carolina por su colaboración, amistad y constancia en la realización de este proyecto de grado.

A mis amigos fuera y dentro de la universidad con quienes compartí y reí, también a aquellos hoy ya no están, a todos ellos que hicieron parte de mis aventuras del día a día, los quiero y los llevo en mi corazón.

A los directores del Proyecto Marianny Combariza y Cristian Blanco que me dieron la oportunidad de trabajar en un proyecto tan enriquecedor.

Al Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander y a su Directora Yolanda Vargas por su colaboración.

Al Laboratorio Químico de Suelos de la Universidad Industrial de Santander y a su Director Jaime Humberto Camargo.

A Javier Moreno por su asesoría en el proyecto y su amistad.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	19
1. MARCO TEÓRICO	20
1.1 condiciones Ambientales para el Desarrollo del Cultivo de Cacao.	20
1.1.1 Contaminación de cacao con cadmio y plomo	21
1.1.2 Análisis de metales pesados en alimentos	25
1.1.3 Riesgos de la salud por contaminación con metales pesados	27
1.1.4 Desarrollo de la técnica analítica para la medición de cadmio y plomo en suelos y granos de cacao fresco y fermentado	29
2. METODOLOGÍA	31
2.1 Mantenimiento de Equipos	31
2.1.1 Equipo de Absorción Atómica	31
2.1.2 Equipos menores	31
2.1.3 Calibración de la balanza	31
2.1.4 Verificación del material volumétrico	31
2.1.5 Protocolo de lavado y secado	31
2.1.6 Verificación de patrones y reactivos	32
2.1.7 Muestreo de Granos de Cacao Fresco, fermentado y suelos	32
2.2. Descripción de Metodologías	33
2.2.1 Tratamiento de las muestras.	33
2.2.2 Determinación de humedad y cenizas en cacao fresco y fermentado	34
2.2.3 Determinación de cadmio en cacao fresco y fermentado	35
2.2.4 Determinación de Cadmio total en suelo	35
2.2.5 Determinación de plomo total en suelo	36
2.2.6 Determinación de cadmio y plomo disponible en suelo	36
2.2.7 Determinación de metales pesados cadmio y plomo por Espectroscopia de Absorción Atómica de Llama (FAAS).	36
3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA	38

3.1 Curvas de Calibración para Cadmio y Plomo	38
3.1.1 Intervalo de validación para cadmio y plomo	38
3.1.2 Linealidad	39
3.2 Validación del Método	39
3.2.1 Descripción de soluciones y muestras para cadmio en cacao fermentado	40
3.2.2 Descripción de soluciones y muestras para cadmio en cacao fresco	41
3.2.3 Descripción de soluciones y muestras para cadmio total en suelos	42
3.2.4 Descripción de soluciones y muestras para cadmio disponible en suelos	43
3.2.5 Descripción de soluciones y muestras para plomo total en suelos	43
3.2.6 Descripción de soluciones y muestras para plomo disponible en suelos	44
3.2.7 Cálculo de las figuras de mérito a partir del diseño experimental	44
3.2.7.1 Límite de detección	45
3.2.7.2 El límite de cuantificación	45
3.2.7.3 Sensibilidad del método	45
3.2.7.4 Precisión	45
3.2.7.5 Exactitud	45
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
4.1 Determinación de Humedad y Ceniza de Cacao Fresco y Fermentado	46
4.2 Método para La Determinación de Cadmio en Cacao Fermentado	47
4.2.2 Linealidad	48
4.2.3 Diseño experimental	49
4.2.3.1 El límite de detección del método (LDM).	50
4.2.3.2 El límite de cuantificación del método	50
4.2.3.3 Sensibilidad del método	50
4.2.3.4 Precisión	50
4.2.3.5 Exactitud	51
4.3 Método para la Determinación de Cadmio en Cacao Fresco	52
4.3.1 Curva de calibración	52
4.3.2 Diseño experimental	53
4.3.3 Exactitud	53

4.4 Método Para La Determinación de Cadmio Total en Suelo	54
4.4.1 Curva de calibración	54
4.4.2 Diseño experimental	54
4.4.3 Exactitud	55
4.5 Método para la Determinación de Cadmio Disponible en Suelo	56
4.5.1. Curva de calibración	56
4.5.2 Diseño experimental	56
4.5.3 Exactitud	57
4.6 Determinación de Plomo Total en Suelo	57
4.6.1 Curva de calibración	57
4.6.2 Diseño experimental	57
4.7 Determinación de Plomo Disponible en Suelo	59
4.7.1 Curva de calibración	59
4.7.2 Diseño experimental	59
4.7.3 Exactitud	59
4.8 Análisis de Muestras Reales	60
4.8.1 Determinación de cadmio y plomo en muestras de cacao fresco y fermentado	60
4.8.2 Determinación de cadmio total en muestras de suelos	62
4.8.3 Determinación de cadmio disponible en muestras de suelos	66
4.8.4 Determinación de plomo total en suelos	70
4.8.5 Determinación de plomo disponible en suelos	72
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXOS	86

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Nivel Máximo Admisible en alimentos manteca y polvo de cacao.	23
Tabla 2. Concentraciones de cadmio y plomo en muestras de chocolate	24
Tabla 3. Concentraciones de cadmio y plomo en muestras de las diferentes etapas del proceso de producción de cacao	24
Tabla 4. Listado de reactivos	32
Tabla 5. Valores de humedad y ceniza de las muestras de cacao fresco.	46
Tabla 6. Valores de humedad y ceniza de las muestras de cacao fermentado.	47
Tabla 7. Lecturas de absorbancia realizadas a los patrones de curva de calibración de cadmio para determinación de cacao fermentado.	47
Tabla 8. Concentración encontrada en las diversas soluciones de trabajo durante 6 días para cadmio en cacao fermentado.	49
Tabla 9. Cálculo del porcentaje de recuperación a rango bajo para determinación de cadmio en cacao fermentado.	51
Tabla 10. Cálculo del porcentaje de recuperación de rango alto para la determinación de cadmio en cacao fermentado.	52
Tabla 11. Concentraciones de cadmio total (mg/kg) en las diferentes fincas de acuerdo con el punto de muestreo y la profundidad del suelo.	64
Tabla 12. Concentraciones de cadmio disponible (mg/kg) en las diferentes fincas de acuerdo con el punto de muestreo y la profundidad del suelo.	68
Tabla 13. Porcentaje de disponibilidad de cadmio en suelo de las fincas uno y tres.	69
Tabla 14. Concentraciones de plomo total (mg/kg) en las diferentes fincas de acuerdo con el punto de muestreo y la profundidad del suelo.	72
Tabla 15. Concentraciones de plomo disponible (mg/kg) en las diferentes fincas de acuerdo con el punto de muestreo y la profundidad del suelo.	74
Tabla 16. Porcentaje de disponibilidad de plomo en suelos de muestreo	75

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Diagrama de la ubicación de las soluciones de trabajo en la curva de calibración para la determinación de cadmio en cacao fermentado	41
Figura 2. Diagrama de la ubicación de las soluciones de trabajo en la curva de calibración para la determinación de cadmio en cacao fresco y cadmio total y disponible en suelo	41
Figura 3. Diagrama de la ubicación de las soluciones de trabajo en la curva de calibración para la determinación de plomo total y disponible en suelo	41
Figura 4. Curva de calibración de cadmio en cacao fermentado.	48
Figura 5. Concentración de cadmio en muestras de cacao fresco y fermentado en las fincas.	60
Figura 6. Cadmio total (A) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca uno.	62
Figura 7. Cadmio total (B) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca tres.	63
Figura 8. Cadmio disponible (C) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca uno.	66
Figura 9. Cadmio disponible (D) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca tres.	67
Figura 10. Plomo total (E) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca uno.	70
Figura 11. Plomo total (F) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca tres.	71
Figura 12. Plomo disponible (H) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca uno.	72
Figura 13. Plomo disponible (I) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca tres.	73

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo A Valores de la distribución t de student para un 95 % de confianza	87
Anexo B Método Para la Determinación de Cadmio en Cacao Fresco	88
Anexo C Método Para la Determinación de Cadmio Total en Suelo	90
Anexo D Método para la Determinación de Cadmio Disponible en Suelo	92
Anexo E Determinación de Plomo Total en Suelo	94
Anexo F Determinación de Plomo Disponible en Suelo	96
Anexo G Resultados Laboratorio Químico de Suelos.	98

## ABREVIATURAS

USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
COPAL	Alianza de Productores del Cacao
AESI	American Environmental Safety Institute
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APROCAFRUM	Asociación de Productores de Cacao y Frutales del Magdalena Medio
ETA	Atomización Electrotérmico
CV	Coefficiente de Variación
CAC	Comisión del Código Alimentario
	Cromatografía de Exclusión por Tamaño Acoplado a
SEC ICP-MS	Espectrómetro de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo
SD	Desviación Estándar
AAS	Espectroscopía de Absorción Atómica
CVAAS	Espectroscopía de Absorción Atómica con Vapor Frío
ETAAS	Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmico
FAAS	Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama
GFAAS	Espectroscopía de Absorción Atómica con Horno de Grafito
HGAAS	Espectroscopía de Absorción Atómica por Generación de Hidruros
TDA-AAS	Espectroscopía de Absorción Atómica con Descomposición Térmica –Amalgamación
ICP-AES	Espectroscopía de Emisión Atómica Plasma de Acoplamiento Inductivo
ICP-MS	Espectroscopía de Masas Plasma de Acoplamiento

	Inductivo
LDI	Límite de detección del Instrumento
LDM	Límite de detección del método
LDC	Límite de cuantificación
MBT	Mercaptobenzotiazol
NMA	Nivel Máximo Admisible
NTC	Norma Técnica Colombiana
NOM	Norma Oficial Mexicana
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
OMS	Organización Mundial de la Salud

## RESUMEN

**TÍTULO:** DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS CADMIO Y PLOMO EN SUELOS Y GRANOS DE CACAO FRESCOS Y FERMENTADOS, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA.

**AUTORAS:** GENNY ROCÍO MARTÍNEZ BASTO Y CAROLINA PALACIO CARREÑO. \*\*

**PALABRAS CLAVES:** Cacao, Suelo, Plomo, Cadmio, Metales pesados.

**DESCRIPCIÓN:** En la actualidad el cacao colombiano sufre de una marcada “estigmatización” en los mercados internacionales como consecuencia del reporte de la presencia de altos niveles de cadmio y plomo los cuales son perjudiciales para la salud. A nivel nacional no existen registros que permitan informar que tan contaminado se encuentra el cacao y el suelo donde se cultiva el mismo. De la problemática anteriormente mencionada, se busca determinar la cantidad de cadmio y plomo presente en muestras de cacao y suelo y para ello se realizó esta investigación en dos fases. En la primera se validaron las técnicas analíticas para la cuantificación de estos metales en cacao fresco y fermentado, empleando la norma AOAC 999.11 y en muestras de suelos la norma EPA 3050B y la NOM 021. El proceso de validación consistió en la lectura durante 6 días de un lote compuesto de dos blancos de reactivo ( $Bl_1$  y  $Bl_2$ ), dos estándares de concentración conocida (0.9C y 0.09C), dos muestras naturales ( $M_1$  y  $M_2$ ), y dos muestras adicionadas ( $M_1+A_1$  y  $M_2+A_2$ ), con lo cuales se determinaron las figuras de mérito de las técnicas analíticas basándose en el protocolo de validación propuesto por el Instituto Nacional de Salud. La segunda fase consistió en el análisis de muestras de cacao y suelo de tres fincas cacaoteras de San Vicente de Chucurí empleando las técnicas anteriormente validadas.

---

\*Tesis de Grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directora: Marianny Combariza.

## ABSTRACT

**TITLE:** DETERMINATION OF HEAVY METALS CADMIUM AND LEAD IN COCOA FIELD SOILS, FRESH AND FERMENTED COCOA BEANS BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY.

**AUTHORS:** MARTINEZ GENNY AND PALACIO CAROLINA. \*\*

**KEY WORDS:** Cocoa, soil, Lead, Cadmium, heavy metals.

**DESCRIPTION** Nowadays, Colombian cocoa suffers a remarkable stigmatization within international markets, due to the report of presence of high levels of lead and cadmium which are unhealthy. In the national scope, there is not any record that contains information about how much contaminated are the cocoa beans and the soil where they are cultivated. Because of these, this work propose to determine the quantity of cadmium and lead present in samples of soil and cocoa beans from the development of two stages. During the first stage, the analytics techniques for quantification of these metals in fresh and fermented cocoa beans were validated, according to the standard AOAC 999.1; an analog procedure was implemented for the treatment of the soil samples, based on the standards EPA 3050B and NOM 021. The validation procedure consisted in the reading of a lot of samples during six (6) days; the lot was composed of two (2) sample blanks of reagent ( $B_1$  y  $B_2$ ), two (2) standards of known concentration (0.9C y 0.09C), two natural samples ( $M_1$  y  $M_2$ ), and two added samples ( $M_1+A_1$  y  $M_2 +A_2$ ). The figures of merit of the analytics techniques were determined based on the validation protocol proposed by the National Health Institute. The second stage included the analysis of samples of cocoa beans and soil taken from three cocoa farms located in San Vicente de Chucurí, by the techniques previously validated.

---

\*Degree Project

\*\* Science Faculty, Chemistry School, Director: Marianny Combariza.

## INTRODUCCIÓN

Santander es el departamento de Colombia con mayor producción de cacao. Sin embargo, aunque el cacao colombiano se conoce internacionalmente por su sabor y calidad, algunos reportes encontrados en la literatura señalan que contiene niveles elevados, 4 mg/kg a 6 mg/kg para Cadmio [1].

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) los límites máximos permitidos de plomo y cadmio en granos de cereales (incluyendo el chocolate) son de 0.2 mg/kg y 0.1 mg/kg, respectivamente [2].

Teniendo en cuenta que el cacao es un alimento de alto consumo que puede contener cantidades considerables de metales pesados, que afectan la salud del consumidor y causan el rechazo del producto en el mercado internacional, en este trabajo se estableció una metodología analítica para la cuantificación de cadmio en cacao, al mismo tiempo una técnica para cuantificar cadmio y plomo total y disponible en suelos. El desarrollo de este proyecto es pertinente porque actualmente no hay información confiable sobre la calidad de los granos y productos procesados de cacao en la región de Santander, en términos de contenido de metales pesados. Esta falta de información se debe en parte a que no existen laboratorios con metodologías establecidas y validadas que realicen el análisis del contenido de éstos metales pesados en cacao. Por esta razón la Escuela de Química, la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander junto con una Asociación Cacaotera de la región de San Vicente de Chucurí soportan la realización de este proyecto de investigación.

Este trabajo de grado se enfoca en dar respuesta a la necesidad que existe, en la región cacaotera de Santander para determinar el contenido de cadmio y plomo en muestras de cacao y suelos.

## **1. MARCO TEÓRICO**

Existen numerosas publicaciones en la literatura científica[1], particularmente durante los últimos años, que reportan el creciente riesgo de acumulación de contaminantes en suelos y cultivos como resultado de la presencia de residuos agroquímicos y varios contaminantes ambientales producto de una excesiva actividad industrial y quema de combustibles fósiles. El caso del cultivo del cacao no es la excepción. Actualmente este producto colombiano sufre de una marcada “estigmatización” en los mercados internacionales como consecuencia del reporte de la presencia de altos niveles de cadmio y plomo. La existencia de metales pesados en frutos tiene una relación directa con la composición del suelo, la disponibilidad de estos elementos y los procesos metabólicos intrínsecos de las plantas.

### **1.1 CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL DESARROLLO DEL CULTIVO DE CACAO.**

El cacao es una planta que necesita un adecuado suministro de agua para su desarrollo. En el caso de Centro y Sur América la lluvia es el factor climático que más variaciones presenta durante el año. Su distribución varía notablemente de una a otra región y es el factor que determina las diferencias en el manejo del cultivo del cacao. La precipitación óptima, durante el año, para el cultivo del cacao es de 1.600 a 2.500 mm. La temperatura óptima, alrededor de 25°C, es fundamental debido a su relación con el desarrollo de la planta, floración y fructificación del cultivo. Adicionalmente regula la absorción de agua y nutrientes, y acelera la descomposición de la materia orgánica en el suelo. Los factores determinantes en el cultivo de cacao son edáficos y climáticos como: temperatura, humedad, precipitación, viento, altitud, un factor secundario es la fertilidad [3,4].

Los suelos apropiados para el cultivo del cacao son aluviales, francos y profundos con subsuelo permeable. El drenaje se determina por las condiciones climáticas del lugar, la topografía, y la capacidad intrínseca del suelo para mantener una adecuada retención de humedad y aireación. El pH del suelo es un importante parámetro que determina la velocidad de descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad de los elementos nutritivos. El cacao se desarrolla eficientemente cuando el pH del suelo se encuentra en el rango de 6.0 a 6.5. Altos contenidos de materia orgánica favorecen el desarrollo del cultivo porque garantizan la presencia de microelementos primordiales en la formación y desarrollo de la planta [4].

1.1.1 Contaminación de cacao con cadmio y plomo. Los metales pesados en alimentos tienen múltiples orígenes. En el caso del cacao es posible que la contaminación del producto se dé en las etapas de cultivo, producción y transformación. Conocer el origen de la contaminación en alimentos es fundamental para determinar las acciones a seguir y para establecer la calidad del producto. A nivel experimental, el análisis de metales pesados en alimentos y suelos involucra recolección, preparación de muestras, extracción de los metales, eliminación de interferencias y finalmente detección y cuantificación mediante técnicas analíticas instrumentales.

Las concentraciones de metales pesados en los suelos están asociadas a los ciclos biológicos y geoquímicos y pueden alterarse por actividades antropogénicas como las prácticas agrícolas, el transporte, las actividades industriales y la eliminación de residuos, entre otras [5]. Por otra parte, es bien conocido que los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes sistemas vivos. La bioacumulación se entiende como un aumento en la concentración de una sustancia química en un organismo vivo en un período de tiempo, cuando se compara con la concentración de la sustancia en el ambiente [6].

Se han establecido que los principales factores que influyen en la movilización de metales pesados en el suelo son el pH, potencial redox, presencia de iones, capacidad de intercambio (catiónico y/o aniónico), contenido de materia orgánica y textura, entre otras. La contaminación por metales puede producir acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad en los suelos [7].

Informes de la Alianza de Productores del Cacao (COPAL) en Nigeria, muestran niveles elevados para plomo de 90 mg/kg en el cacao producido en esta región del planeta. COPAL es el proveedor del 75% de todos los granos de cacao en el mercado mundial. Se ha establecido que el plomo en cacao tiene múltiples orígenes. En primer lugar puede estar presente en el suelo donde se cultiva u originarse de prácticas agrícolas como la aplicación de fertilizantes y otros aditivos para los suelos. Es posible que provenga también de procesos de deposición atmosférica en los suelos o durante el tratamiento postcosecha que incluye secado al aire libre, transporte, almacenamiento, molienda y transformación en productos alimenticios de consumo [8].

Por ejemplo, en el noreste de Italia un estudio de varios tipos de suelos cultivables determinó que en la zona de Carmagnola el nivel de cadmio y plomo es de 5.4 mg/kg y 215 mg/kg respectivamente. Por otra parte, la zona de Poirino presenta niveles de 2.7 mg/kg y 141 mg/kg para cadmio y plomo [9]. En Valencia y Murcia se encontró un aumento del contenido de cadmio y plomo en suelos y productos agrícolas debido a la actividad industrial de la zona y a procesos de dispersión atmosféricos [10].

Estudios en Venezuela demostraron que la concentración de cadmio en suelo y granos de cacao se encuentra por debajo del nivel máximo permisible de cadmio en suelo no contaminado, que es 1mg/Kg. Se estableció, por otra parte, que la relación cinc/cadmio es superior a 1000 lo que significa que el cinc disminuye la

eventual absorción del cadmio por la raíz del árbol. Con respecto a las almendras los niveles de cadmio no superaron los 0.05 mg/Kg [11].

Existen diversas normas y regulaciones dependiendo de la región y el mercado, para los niveles permisibles de metales pesados en granos y productos de cacao procesados. Recientemente la Comisión del Código Alimentario (CAC) propuso un valor para el nivel máximo admisible (NMA) de plomo de 0,1 mg/kg en manteca de cacao (un ingrediente clave en el chocolate) y 1,0 mg/kg para masa de cacao y cacao en polvo. La ingesta semanal tolerable propuesta provisionalmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 7 a 25 µg/kg por semana de peso corporal para cadmio y plomo. Sin embargo, en la India, el contenido de plomo en chocolate es 1.92 mg/kg, casi el doble del NMA en cacao en polvo y manteca de cacao [12].

**Tabla 1. Nivel Máximo Admisible en alimentos manteca y polvo de cacao.**

<b>INSTITUCIONES REGULADORAS</b>	<b>CONCENTRACIONES DE PLOMO (mg/kg)</b>	<b>CONCENTRACIONES DE CADMIO (mg/kg)</b>
Comisión de Código alimentario (CAC)	0.2	0.1
Organización Mundial de la Salud (OMS)	0.18-1.200	0.1
American Environmental Safety Institute (AESI)	0.002-0.105	0.002-0.136

Fuente: Lead contamination in cocoa and cocoa products: isotopic evidence of global contamination[12].

Existen estudios relacionados con la determinación de las concentraciones y la biodisponibilidad de cadmio y plomo en cacao y productos afines (la almendra, el licor, la manteca) de diferentes orígenes geográficos. Por ejemplo, se ha establecido que el cacao proveniente de países productores de América del Sur (exceptuando Brasil) contiene más cadmio, en concentraciones superiores a los límites tolerables, que el producido en África y Asia (Costa de Marfil, Ghana, Malasia). Un estudio reciente del American Environmental Safety Institute (AESI)

señala que las concentraciones de plomo en los productos de chocolate están entre 0.002 mg/kg y 0.105 mg/kg mientras que las de cadmio oscilan entre 0.002 mg/kg y 0.136 mg/kg, valores por debajo de los legalmente admisibles, en países como Nigeria y Costa de Marfil [13].

**Tabla 2. Concentración de cadmio y plomo en muestras de chocolate.**

CONCENTRACIONES DE CADMIO EN (ug/kg)[13]							
Origen de la muestra	Malasia	Venezuela	Ecuador	Bahía Brasil	Habuna Brasil	Costa de Marfil	Ghana
<b>Cd</b>	602±73	1833±20	738±53	125±7	170±25	94±14	133±20
<b>Pb</b>	229±69	173±12	197±0	150±9	796±154	191±39	52±10

Fuente: Lead in cocoa and chocolate: Rankin and Flegalrespond[13].

Por otra parte los máximos niveles tolerables de cadmio en chocolate y en polvo de cacao en Alemania, Finlandia, Europa Central y Malasia son de 0.4, 0.5 y 1.0 mg/kg respectivamente. Según el Códex Alimentario y la legislación de algunos países europeos los valores permitidos de plomo y cadmio son 2 mg/kg y 0.1 mg/kg, muy por encima de los niveles permitidos por las legislaciones individuales de los países.

**Tabla 3. Concentraciones de cadmio y plomo en muestras de las diferentes etapas del proceso de producción de cacao.**

CONCENTRACIONES DE CADMIO ( $\mu\text{g Cd/Kg}$ )[14]						
Muestras	Granos fermentados		Granos Tostados	Licor de cacao	Cacao en polvo	Manteca de cacao
<b>El Oro Ecuador</b>	375±52	42±13	460±14	282±4	533±16	10±0
<b>Ecuador</b>	ND		ND	480±14	738±53	7±0
<b>Venezuela</b>	ND		ND	1082±5	1833±20	7±0
CONCENTRACIONES DE PLOMO ( $\mu\text{g Pb/Kg}$ )						
Muestras	Granos fermentados		Granos Tostados	Licor de cacao	Cacao en polvo	Manteca de cacao
<b>El Oro Ecuador</b>	42±13		51±0	10±0	11±3	22±1
<b>Ecuador</b>	ND		ND	146±8	197±0	25±1
<b>Venezuela</b>	ND		ND	104±13	173±12	15±2

ND. No detectado. Los datos son la media SD de tres mediciones.

Fuente: Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products[14].

Existen reportes provenientes de diferentes países acerca de la presencia y medición de los niveles de metales pesados. Por ejemplo, se ha establecido la presencia de níquel, plomo y cadmio en 69 diferentes marcas de chocolates y caramelos disponibles en los mercados locales de las zonas suburbanas de Bombay, India. La mayoría de estos chocolates y dulces están hechos principalmente de cacao, leche, frutos secos, sabores de fruta y azúcar. De las 69 marcas de chocolates y caramelos analizados, 23 eran a base de cacao, 22 a base de leche y otros 24 son de sabor de fruta y base de azúcar. Se determinó la presencia de cadmio en niveles que van desde 0.001 a 2.73 mg/kg, el níquel por otra parte está presente en intervalos de 0.041 a 8.29 mg/kg y el plomo entre 0.049 a 8.04 mg/kg. Los chocolates a base de cacao mostraron tener mayor contenido de metales pesados que los analizados con respecto a los dulces de leche, sabores de fruta y azúcar [14,15].

También se estudió el contenido de cobre, níquel, plomo, hierro, manganeso, cromo y cadmio en 17 marcas de goma de mascar y caramelos distribuidos en los mercados locales de Kayseri, Turquía. De las 17 marcas de gomas de mascar y confites analizados, cuatro fueron a base de cacao, dos de azúcar y otro a base de fruta. El plomo presentó valores de 0.031 a 2.46 mg/kg y cadmio de 0.02 a 0.825 mg/kg. También se encontró que los productos a base de cacao tienen mayor contenido de metales pesados a diferencia de las muestras a base de azúcar y fruta. Pese a estos resultados los niños son los principales consumidores de estos productos comerciales y los más susceptibles a la intoxicación por plomo [16].

1.1.2 Análisis de metales pesados en alimentos. Existen diversas metodologías para la determinación de metales en alimentos, en su mayoría basadas en técnicas electroquímicas y espectroscópicas [17]. Dentro de las espectroscópicas las más conocidas son Espectroscopía de Absorción Atómica con Vapor Frío (CVAAS), Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica

(ETAAS), Espectroscopía de Absorción Atómica por Generación de Hidruros (HGAAS), Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama (FAAS), Espectroscopía de Masas Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), Espectroscopía de Emisión Atómica Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES), Espectroscopía de Absorción Atómica con Descomposición Térmica – Amalgamación (TDA-AAS) [18]. Existen también varias opciones para la preparación de la muestra que en muchos casos depende de la matriz y la técnica de medición empleada. Sin embargo para análisis de metales en alimentos son comunes los procesos de digestión húmeda y seca, en algunos casos acelerados por radiación de microondas [19].

La digestión de la muestra a menudo es un procedimiento lento que tiene problemas asociados de disolución incompleta, precipitación de análitos insolubles, contaminación, y pérdidas de elementos volátiles. Una técnica alternativa de la digestión húmeda, es el uso de la radiación de microondas. En este estudio desarrollado por *Mehmet Y, Durak M.*, se compararon los métodos de digestión en seco, húmedo, y horno microondas en la cuantificación de aluminio, cinc, hierro en yogur por AAS estableciéndose que la digestión de microondas, es el mejor método para cuantificar porque registró óptimos resultados, como aluminio 46 mg/kg, cinc 2 mg/kg y hierro de 3.5 mg/kg [20].

Para la determinación de metales pesados en muestras de tejidos (peces) se han encontrado límites de detección de plomo y cadmio, utilizando ETAAS, de 6.4 ng/g y 0.14 ng/g. La AAS presenta niveles de detección similares para muestras biológicas y de tejidos animales 20 µg/Kg y 0.6 µg/Kg[28]. El investigador *Mustafá Tuzen*, determinó trazas de metales en muestras de peces por ETAAS con límites de detección para cadmio 0.0788, cobre 0.344, níquel 1.825, plomo: 0.968 y el cinc 0.0127 mg/Kg, respectivamente [21].

Estudios utilizando ETAAS y AAS para determinar plomo y cadmio en mariscos del mediterráneo español demuestran que la concentración de estos metales tiene

una correlación directa con el grado de contaminación de las aguas del mar donde se desarrollan los animales [22].

Agente quelante como el 2-mercaptobenzotiazol (MBT) se ha empleado para la determinación de trazas de plomo y cadmio en diferentes muestras de alimentos como salami, salchichas, anchoas, espinacas, col, cebolla, eneldo, perejil, lechuga, té y muestras de arroz, por espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS). Se encontró Pb (II) y Cd (II) en anchoas 6.63 ng/g, espinacas 3.30 ng/g, embutidos 2.67 ng /g y 0.51 µg/g en lechuga [23].

Existen algunas investigaciones sobre la evaluación de metales pesados y oligoelementos en el chocolate. Por ejemplo: un estudio muy completo sobre la presencia de metales pesados (plomo, cadmio, arsénico, mercurio y níquel) y minerales (hierro, cobre y cinc) en tres clases de chocolate (claro, de leche y pistacho) de una misma marca provenientes de Turquía empleando técnicas FAAS y GFAAS se realizó comparando el proceso de digestión convencional y la digestión asistida con microondas, se obtuvo 0.549 mg/kg de cadmio y 0.175 mg/kg de plomo [24].

El análisis de alimentos, té con base en cacao, café, cereales, productos lácteos, zumos de frutas, bebidas de malta, gaseosas y vinos disponibles en el mercado en Nigeria con relación a su contenido de metales pesados estableció que los niveles son bajos y se encuentran dentro de los límites de seguridad alimentarios [14]. Por otra parte, se ha establecido que en Alemania, las bebidas corresponden al 43, 36 y 31% del total de plomo, cadmio y mercurio, en la dieta [25].

1.1.3 Riesgos de la salud por contaminación con metales pesados. Algunos metales como cobalto, cromo, hierro, manganeso, y cinc, son vitales en procesos metabólicos pues hacen parte de metaloenzimas, mientras otros como arsénico, cadmio, mercurio y plomo no tienen efectos beneficiosos y no se conocen mecanismos de homeóstasis en humanos [26]. En los seres humanos, la

deficiencia ó el exceso de un oligoelemento puede influenciar la absorción, distribución, metabolismo y la eliminación de otros. Por ejemplo la deficiencia de hierro, conocida como anemia hipocrómica, causa un aumento en la absorción de plomo y cadmio en el tracto gastrointestinal [27].

La absorción de cadmio por las plantas en suelos contaminados y su incorporación a la cadena alimenticia, tiene en la actualidad mucha importancia debido a que este elemento puede alterar el metabolismo humano compitiendo con el hierro, cobre, cinc, manganeso y selenio por ligantes en los sistemas biológicos [28]. Además el ión cadmio divalente disminuye significativamente la absorción intestinal del hierro en el cuerpo humano [29]. Cuando se ingiere un alimento contaminado con cadmio el metal se acumula en los riñones donde su vida media de permanencia es de 18 a 30 años, lo que demuestra la gran dificultad en la eliminación del cadmio por el organismo [30]. Con relación a la presencia de cadmio en cacao, se han reportado concentraciones de 1.8 mg/kg en almendras secas desgrasadas en España [31]. Otros reportes señalan niveles de 0.07 a 0.36 mg/kg en almendras de cacao de tipo amelonado, trinitario y amazónico provenientes de Nigeria [25].

Por su parte el plomo causa problemas en el desarrollo del sistema nervioso central del feto. En recién nacidos, el plomo puede ocasionar daños al cerebro y a los nervios periféricos, que son encargados de enviar información sensorial (tacto, dolor) del cuerpo hacia el sistema nervioso central a través de la médula espinal. En niños la exposición al plomo ha sido asociada con el coeficiente intelectual reducido, desórdenes de aprendizaje, crecimiento lento, comportamiento hiperactivo, antisocial y deterioro del oído. En general el plomo perjudica el riñón, el hígado, el sistema reproductivo además de afectar también procesos básicos de funcionamiento celular y la funcionalidad del cerebro [32].

Existen reportes sobre la relación entre la presencia de metales pesados, como cadmio y plomo, en alimentos con la salud pública y ambiental. Casos extremos de intoxicación, concentraciones de 20 mg/kg ó más de cadmio, tienen como consecuencia daños graves a los órganos internos y alteraciones genéticas [33]. Estudios poblacionales sobre toxicidad y la acumulación de cadmio sugieren que un considerable número de individuos presenta niveles tóxicos de cadmio en sus riñones, a pesar de las restricciones sobre niveles mínimos de cadmio permitidos en la ingesta de alimentos. Algunos autores aseguran que si la incorporación de

cadmio en la dieta humana continúa aumentando, en los próximos 10 a 20 años se prevé un aumento en los casos de disfunción tubular renal particularmente en grupos de riesgo elevado tales como los diabéticos y personas con bajo consumo de vitamina C [34].

De acuerdo con algunos investigadores, la mayoría de programas de salud pública con relación a la acumulación de cadmio son preventivos debido a carencia de agentes quelantes terapéuticos eficaces que acomplejen y promuevan excreción del cadmio de los riñones [35]. Por otra parte, para tener una idea más completa sobre el proceso de intoxicación con metales pesados en seres humanos se ha propuesto el estudio de los complejos de estos metales con moléculas ligantes, como los fitatos, presentes en el cacao y su relación con la biodisponibilidad, absorción y acumulación del metal en el organismo [36].

Con base en la información expuesta anteriormente y teniendo en cuenta que no se encuentra información relacionada con la determinación de metales pesados en cacao y productos de su procesamiento en Colombia resulta pertinente el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de cadmio y plomo en cacao y su aplicación en la medición de las concentraciones de estos contaminantes en productos provenientes de la región de San Vicente de Chucurí en Santander.

1.1.4 Desarrollo de la técnica analítica para la medición de cadmio y plomo en suelos y granos de cacao fresco y fermentado. Durante el desarrollo de una técnica analítica es fundamental la determinación de las figuras de mérito relacionadas con la medición. Estos parámetros de confiabilidad describen, los rangos y condiciones de trabajo de la técnica además de sus atributos y sus limitaciones.

Por una parte los límites de detección y cuantificación están relacionados respectivamente con la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada por el método, y con la concentración más baja que se puede determinar de forma reproducible, con criterios de exactitud y precisión establecidos. El límite de cuantificación se realiza mediante la preparación de un número estipulado de blancos a los cuales se realiza la cuantificación del análisis de interés [37].

La linealidad y la sensibilidad se establecen a partir de la curva de calibración y hacen referencia a la proporcionalidad que existe entre la concentración del análisis y la señal del instrumento, y el factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración, respectivamente. Normalmente, la sensibilidad se mide como la pendiente de la curva de calibración [38].

La precisión se utiliza para describir que tan reproducibles son las mediciones; es decir, qué tan semejantes son los resultados que se han obtenido exactamente de la misma manera. Para describir la precisión de un conjunto de datos repetidos se utilizan dos términos muy conocidos: La desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) [39].

La exactitud indica qué tan cercana está una medición de su valor verdadero o aceptado, y se expresa como error. Es pertinente mencionar la diferencia fundamental entre exactitud y precisión. La exactitud mide la concordancia entre un resultado y su valor verdadero; la precisión mide la concordancia entre varios resultados.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 MANTENIMIENTO DE EQUIPOS

A los equipos usados en el desarrollo del proyecto se les realizó el mantenimiento preventivo correspondiente para garantizar condiciones óptimas de operación.

2.1.1 Equipo de Absorción Atómica. Las medidas de absorción atómica se realizaron en un equipo THERMO ELECTRON modelo S4, al cual la empresa INNOVATEK realiza el mantenimiento preventivo.

2.1.2 Equipos menores. En el desarrollo de las metodologías se usaron una manta de calentamiento, una mufla, una estufa, estos equipos no necesitan calibraciones para el uso previsto, sólo se verificó su correcto funcionamiento.

2.1.3 Calibración de la balanza. La empresa MetroCal Ltda. Organización autorizada para realizar calibración de balanzas, verificó y calibró la balanza analítica con la expedición del correspondiente certificado de calibración.

2.1.4 Verificación del material volumétrico. Se realizó la lista del material volumétrico necesario para desarrollar las metodologías. Antes de realizar cualquier ensayo se siguió el protocolo de lavado y secado del material.

2.1.5 Protocolo de lavado y secado. Por tratarse de material usado para el análisis de metales se efectuó el siguiente protocolo de lavado y secado.

- Sumergir el material completamente en una solución de Extran al 1 % por 2 horas.
- Enjuagar el material con abundante agua de la llave hasta retirar completamente la capa jabonosa.

- Enjuagar con solución de ácido nítrico al 1%.
- Enjuagar mínimo tres veces con agua destilada.
- Colocar el material en el área de secado, el material se debe escurrir y el secado debe ser por goteo. Para esto los balones se deben almacenar boca abajo, pipetas y buretas se deben almacenar en forma vertical.
- Una vez secado el material se debe guardar para protegerlo del polvo.

2.1.6 Verificación de patrones y reactivos. El método analítico requiere del uso de patrones de referencia con certificado de pureza que permitan dar certeza a las medidas. La tabla 4 lista los reactivos y el material de referencia certificado que se utilizaron para la realización del proyecto.

**Tabla 4. Listado de reactivos**

<b>CADMIO EN CACAO FRESCO Y FERMENTADO</b>	<b>CADMIO TOTAL EN SUELO</b>	<b>PLOMO TOTAL EN SUELO</b>	<b>CADMIO Y PLOMO DISPONIBLE EN SUELO</b>
Ácido clorhídrico 6M Ácido nítrico 0.1 M Patrón de Cadmio NIST CERTIPUR	Ácido clorhídrico 37% Ácido nítrico 65% Peróxido de Hidrogeno 30%	Ácido clorhídrico 37% Ácido nítrico 65% Patrón de Plomo NIST CERTIPUR	Solución extractante de: DTPA (ácido dietilen-triamino-pentaacético), Cloruro de calcio dihidratado, Trietanolamina.

2.1.7 Muestreo de Granos de Cacao Fresco, fermentado y suelos. Las áreas de muestreo fueron seleccionadas con el apoyo de Asociación de Productores de Cacao y Frutales del Magdalena Medio (APROCAFRUM). Los sitios de muestreo corresponden a áreas de cultivo de cacao con altas y bajas concentraciones de cadmio, de acuerdo con información suministrada por miembros de la asociación. La finca uno, ubicada en la vereda Campo Hermoso se seleccionó por producir granos de cacao con altas concentraciones de cadmio. El cultivo de cacao en esta finca está establecido por más de 20 años. Las fincas dos y tres de la vereda de Santa Inés se seleccionaron por producir granos de cacao con bajas concentraciones de cadmio. Todos los sitios de muestreo están ubicados en el

municipio de San Vicente de Chucurí (SANTANDER). El muestreo se realizó en equis (Cline), se tomaron submuestras de mazorcas maduras por árbol en los 5 sitios de muestreo y en esta misma posición 10 submuestras de suelo con dos tipos de profundidades 0-20 cm y 20-40 cm, respectivamente (Comité) [40,41].



Muestreo de Cacao y Suelo



## 2.2. DESCRIPCIÓN DE METODOLOGÍAS

2.2.1 Tratamiento de las muestras. Las submuestras de cacao, fueron recolectadas, y almacenadas en una nevera de icopor con hielo seco para asegurar la integridad de las muestras durante el transporte de las mazorcas al laboratorio. Posteriormente, se extraen las almendras, se guardan en bolsas con cierre hermético, se rotulan y almacenan en el congelador a menos de 4°C.

Las muestras de suelos fueron llevadas al laboratorio, donde se extendieron en bandejas rotuladas y se dejaron secar al aire en un espacio abierto y limpio por 96 horas. Luego del secado se eliminan los restos vegetales (raíces, hojas, etc.), se trituran en un mortero y se pasan por un tamiz 2 mm de diámetro. Las muestras se almacenan en recipientes plásticos hasta el análisis (Carter) [42].

Para el desarrollo de esta investigación se efectuaron los procedimientos analíticos relacionados a continuación:

2.2.2 Determinación de humedad y cenizas en cacao fresco y fermentado. La medición de humedad en muestras de cacao fresco y fermentado se efectuó siguiendo el procedimiento de la AOAC 13.0001/98. En resumen se pesan 2 gramos de muestra que se llevan a una estufa a 105°C durante 24 horas. Posteriormente, se pasan a un desecador y se pesan nuevamente. El porcentaje de humedad se calcula por pérdida de peso de acuerdo con la ecuación 1 [43].

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{peso.muestra.húmeda} - \text{peso.muestra.seca}}{\text{peso.muestra.húmeda}} * 100 \quad (1)$$

El contenido de ceniza está relacionado con la cantidad de minerales en el grano de cacao. Para la determinación de cenizas en productos con alto contenido de grasa (mayor ó igual a 40%) como el licor y la manteca de cacao es necesario proceder con cautela para evitar su auto combustión. La determinación de cenizas en muestras de cacao fresco y fermentado se realizó siguiendo el procedimiento de la AOAC 13.005/98 adaptado. El cálculo de las cenizas se hace de acuerdo con la ecuación 2 [44].

$$\% \text{Ceniza.en.base.seca} = \frac{\text{Peso.de.ceniza}}{\text{Peso.de.la.muestra}} * 100 \quad (2)$$

2.2.3 Determinación de cadmio en cacao fresco y fermentado. En el caso de la determinación de cadmio en granos de cacao fresco y fermentado inicialmente se eliminó el mucílago de las almendras frescas y la cáscara de los granos fermentados; seguidamente, se procedió a macerarlas, homogeneizarlas y mezclarlas, se pesaron alrededor de 15 g de muestra en crisoles y se colocaron en la mufla con una programación de temperatura de 0 a 450°C con una duración de 5 horas. Posteriormente, se apagó el horno y la muestra se dejó dentro. La ceniza se humedeció con 3 mL de agua destilada, se homogenizó y se evaporó. Nuevamente, se colocó la muestra en la mufla con una rampa de calentamiento de 100°C/h hasta 450°C por dos horas.

La ceniza obtenida después de este procedimiento presentaba una coloración blanco/gris. Después, se trató con 5 mL de ácido clorhídrico 6M seguida de agitación para asegurar el contacto de toda la ceniza con el ácido. La mezcla se evaporó. Luego se disolvió el residuo con ácido nítrico 0.1M y se agitó. La solución en el crisol cubierto se dejó en reposo por 2 horas. Finalmente, se agitó, se filtró en un balón aforado de 100mL, se aforó a ese volumen con solución de ácido nítrico 1% y se transfirió el contenido a botellas plásticas (AOAC 999.11: 2000) [45].

2.2.4 Determinación de Cadmio total en suelo. Se pesaron 2.5 gramos de suelo homogenizado y se colocaron en un vaso de precipitado al cual se adicionaron 25 mL de ácido nítrico 1:1 y se cubrió con un vidrio de reloj. La mezcla se calentó a  $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  en reflujo durante 15 minutos. Después de enfriamiento se adicionaron 5 mL de ácido nítrico y se mantuvo el reflujo por 30 minutos. Posteriormente se añadieron 5 mL de agua y 7.5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% hasta un volumen máximo de 15 mL. Luego se añadieron 25 mL de ácido clorhídrico concentrado seguidos de calentamiento por 15 minutos. La solución resultante se filtró en un balón aforado de 50 mL, se aforó y se transfirió a un recipiente plástico (USEPA 3050B) [46].

2.2.5 Determinación de plomo total en suelo. Se pesaron 2.5 gramos de suelo homogenizado y se colocaron en un vaso de precipitado al cual se adicionaron 6.25 mL de ácido nítrico concentrado y 15 mL de ácido clorhídrico y se cubrió con un vidrio de reloj. La mezcla se calentó a  $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  se dejó en reflujo durante 15 minutos. Se filtró y se agregó una solución de 12.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y 20 mL de agua para aforar a 50 mL. Se agregaron 5 mL de ácido clorhídrico concentrado al residuo y se calentó hasta que se desintegró el papel, se filtró la solución con papel de filtro Whatman N.41 en el mismo balón, se aforó y se transfirió a un recipiente plástico (USEPA 3050B) [46].

2.2.6 Determinación de cadmio y plomo disponible en suelo. La solución extractora de iones cadmio y plomo disponibles en suelos se preparó disolviendo 1.97 gramos de DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), 1.47 de cloruro de calcio dihidratado y 13.3 mL de Trietanolamina en 300 mL de agua destilada. La solución se sometió a agitación por dos horas y se llevó a pH 7.3 con ácido clorhídrico 1:1, posteriormente se aforó con agua destilada a 1 L.

Se pesaron 10 gramos de suelo homogenizado y se agregaron 20 mL de la solución extractora. La mezcla se agitó durante dos horas y se filtró con papel Whatman N. 42, el filtrado se recogió en tubos de ensayo para lectura directa por FAAS (SEMARNAT) [47].

2.2.7 Determinación de metales pesados cadmio y plomo por Espectroscopia de Absorción Atómica de Llama (FAAS). La determinación de los metales pesados se realizó utilizando un espectrofotómetro de Absorción Atómica Thermo. Como gas de combustión se utilizó una mezcla de Aire-Acetileno a una presión de entrada de 2.5 Pa y un flujo de 1.0L/minuto. La absorbancia de las muestras se leyó directamente a una longitud de onda de 228.8 nm para cadmio y 283.3 nm para plomo. A partir del patrón certificado de 1000 mg/L cadmio y plomo,

respectivamente, se realizaron las curvas de calibración de 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.3, 1.5, 1.8 mg/L para cadmio y de 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10, 13, 15, 18 mg/L para plomo.

Finalmente, los procedimientos desarrollados se aplicaron al análisis de muestras reales recolectadas de fincas cacaoteras de la región de San Vicente de Chucurí.

### 3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

En esta sección se describe en forma detallada el procedimiento usado para el cálculo de las principales figuras de mérito utilizadas como criterio de confianza en la implementación de las metodologías de medición.

#### 3.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA CADMIO Y PLOMO

Se tomaron 5 mL de un patrón de cadmio de 1000 mg/L, se colocaron en un balón aforado de 500 mL, se aforó con  $\text{HNO}_3$  al 1%. Esta solución de 10 mg/L de cadmio se rotuló “solución madre”.

De la solución madre se midieron alícuotas de 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13 y 15 mL que se aforaron a 100 mL con agua destilada en  $\text{HNO}_3$  al 1%, para preparar patrones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.3 y 1.5 mg/L de cadmio, respectivamente. Se preparó un blanco que contenía agua destilada en  $\text{HNO}_3$  al 1%. La curva de calibración fue leída cada vez que se analizaron las muestras y patrones.

Se tomaron 25 mL de un patrón de plomo de 1000 mg/L, y se colocaron en un balón aforado de 500 mL, se aforó con  $\text{HNO}_3$  al 1%. Esta solución de 50 mg/L de plomo se rotuló “solución madre”.

De la solución madre se midieron alícuotas de 2, 4, 6, 10, 14, 20, 26 y 30 mL que se aforaron a 100 mL con agua destilada en  $\text{HNO}_3$  al 1%, para preparar patrones de 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13 y 15 mg/L de plomo, respectivamente. Se preparó un blanco que contenía agua destilada en  $\text{HNO}_3$  al 1%. La curva de calibración fue leída cada vez que se analizaron las muestras y patrones.

3.1.1 Intervalo de validación para cadmio y plomo. Según la curva de calibración descrita anteriormente el intervalo de determinación para cadmio y plomo es de

0.1-1.8 mg/L y 1-15.0 mg/L. El manual del equipo de absorción atómica asegura linealidad dentro de este intervalo.

3.1.2 Linealidad. Se realizó la prueba de  $t$  de *student* a la recta de mínimos cuadrados para comprobar la linealidad de la curva dentro del rango de validación. Fue necesario utilizar una prueba estadística para verificar si el coeficiente de correlación era realmente significativo, considerando el número de pares de valores usados en su cálculo. El método más simple fue calcular el valor  $t$  usando la ecuación 3.

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (3)$$

Donde  $r$  es el coeficiente de correlación y  $n$  el número de pares usados para calcular  $r$ . El valor calculado de  $t$  se compara con el tabulado al nivel de significación deseado, usando una prueba  $t$  de dos colas y  $(n-2)$  grados de libertad ver anexo A. La hipótesis nula en este caso es que no existe correlación entre  $X$  y  $Y$ . Si el valor calculado de  $t$  es mayor que el tabulado la hipótesis nula se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa [39].

### 3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación de los métodos analíticos utilizados para la determinación de cadmio y plomo en cacao y suelos, se basó en el diseño propuesto por el Instituto Nacional de Salud expuesto en el curso-taller validación de métodos analíticos, dentro del programa: “Vigilancia de la calidad del agua potable, metales y no metales de interés en salud pública” [38].

En este diseño de validación se requiere analizar diariamente un lote de seis muestras durante seis días, cada lote se compone de la siguiente forma:

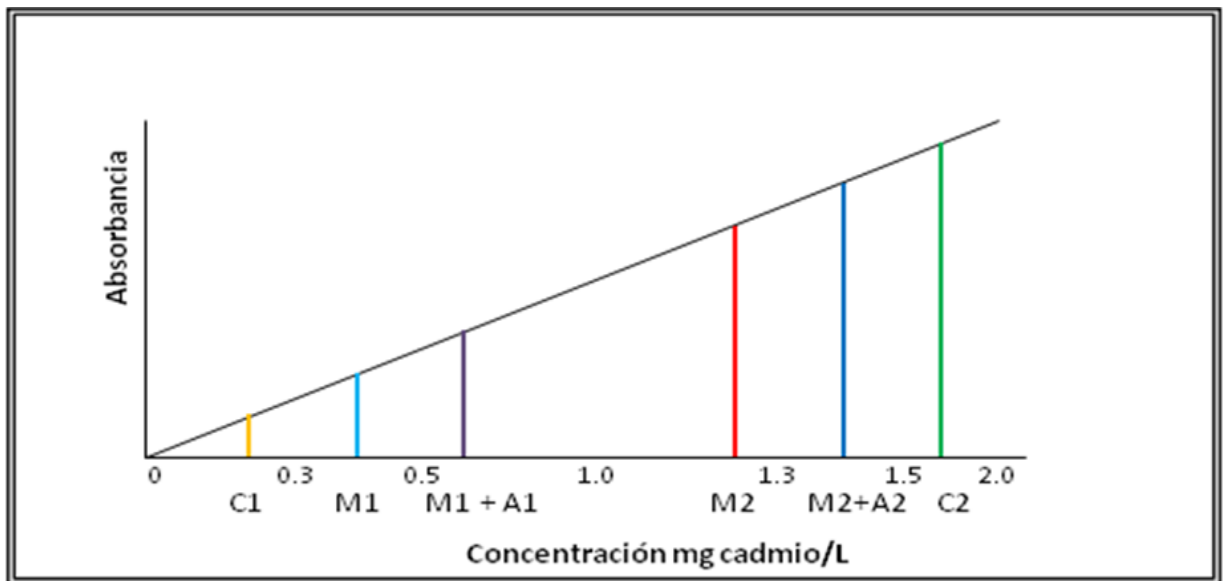
- **Dos blancos de muestra ( $B_1$  y  $B_2$ ).** Conocidos como soluciones testigo, se preparan agregando cadmio ó plomo en las cantidades correspondientes a los límites de detección instrumental y se someten al procedimiento analítico establecido para cada método.
- **Dos soluciones estándares ( $C_1$  y  $C_2$ ).** Con la curva de calibración de cadmio y plomo se identifica el límite superior  $C$ , estableciendo a partir de éste dos soluciones estándares de  $C_1$  ( $0.09C$ ) y  $C_2$  ( $0.9C$ ), respectivamente para cada método.
- **Dos muestras reales ( $M_1$  y  $M_2$ ).** Se escogen dos muestras con valores  $M_1$  (rango bajo) y  $M_2$  (rango alto) de tal forma que cubran por debajo y por encima del 50% del rango lineal establecido en las curvas de calibración para cada metal.
  - .
- **Dos muestras adicionadas ( $M_1+A_1$  y  $M_2+A_2$ ).** Muestras reales a las cuales se les adiciona la cantidad necesaria  $A_1$  y  $A_2$  de cadmio ó plomo de tal forma que se encuentren dentro del rango establecido anteriormente.

### 3.2.1 Descripción de soluciones y muestras para cadmio en cacao fermentado

- **Solución Testigo:** Permitió la estimación del límite de detección y límite de cuantificación del método. Se preparó adicionando todos los reactivos a dos blancos de muestras de cacao fermentado más  $5 \times 10^{-3}$  mg/L de solución de cadmio correspondiente al límite de detección instrumental. La solución testigo se sometió al mismo procedimiento analítico de las muestras.
- **Soluciones estándares:** Conociendo que el límite superior en concentración era de 2.0 mg/L ( $C$ ) se prepararon dos soluciones estándares:  $C_1$  de  $0.09C$  (0.18 mg/L) y  $C_2$  de  $0.9C$  (1.8 mg/L).

- Muestras Reales: Permitieron estimar la precisión del método y para ello se tomaron muestras de cacao fermentado de tal forma que sus valores correspondieran a  $M_1$  y  $M_2$ .
- Muestras adicionadas: Permitieron estimar la exactitud del método. A cada masa  $M_1$  y  $M_2$  se adicionó 0.02 mg de cadmio.
- El diseño de validación pretende monitorear durante un intervalo de tiempo el comportamiento de las diversas soluciones, que idealmente se deben ubicar en rangos definidos. La figura 1 muestra la región en donde se deben ubicar las soluciones.

**Figura 1. Diagrama de la ubicación de las soluciones de trabajo en la curva de calibración para la determinación de cadmio en cacao fermentado.**

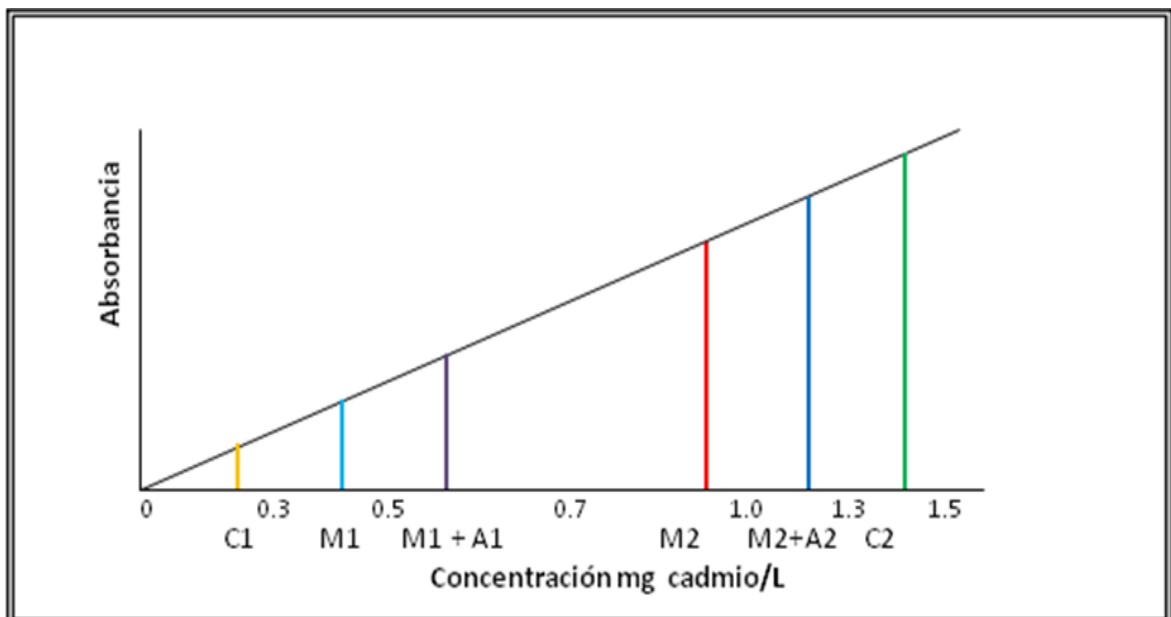


### 3.2.2 Descripción de soluciones y muestras para cadmio en cacao fresco

- La solución testigo se preparó como se describe en el numeral 3.2.1, utilizando muestras de cacao fresco.
- Soluciones estándares:  $C_1 = 0.13 \text{ mg/L}$  y  $C_2 = 1.35 \text{ mg/L}$ .

- Muestras Reales:  $M_1$  en el rango de 0.3-0.5 mg/L y  $M_2$  entre 0.9-1.3 mg/L, para evaluar todo el rango de validación el cual fue hasta 1,5 mg Cd/L.
- Muestras adicionadas: A  $M_1$  se le adicionó 0.02 mg y a  $M_2$  0.03 mg de cadmio. Ver Figura 2.

**Figura 2. Diagrama de la ubicación de las soluciones de trabajo en la curva de calibración para la determinación de cadmio en cacao fresco y cadmio total y disponible en suelo.**



### 3.2.3 Descripción de soluciones y muestras para cadmio total en suelos

- Solución testigo se preparó adicionando todos los reactivos a un blanco de suelo como se describe en el numeral 3.2.1.
- Soluciones estándares: Se preparan dos soluciones estándares como se describe en el numeral 3.2.2
- Muestras Reales: Se escogieron las muestras de suelo del municipio de San Vicente de Chucurí, donde  $M_1$  esta en el rango de 0.3-0.5 mg/L y  $M_2$  entre 0.9-

1.3 mg/L, para evaluar todo el rango de validación el cual fue hasta 1,5 mg Cd/L.

- Muestras adicionadas: Se adicionó 0.01 mg de Cadmio para  $M_1$  y  $M_2$  respectivamente. Ver Figura 2.

### **3.2.4 Descripción de soluciones y muestras para cadmio disponible en suelos**

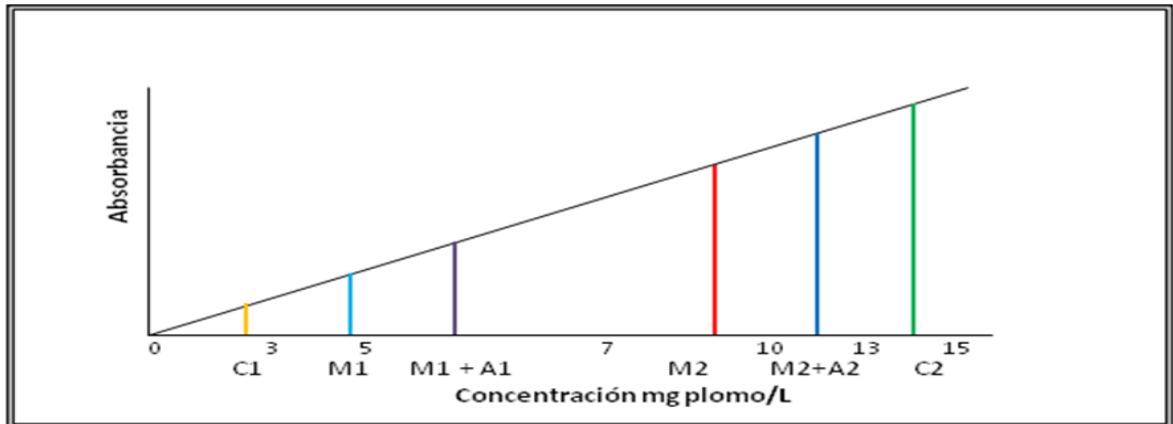
- Solución testigo se preparó adicionando todos los reactivos a dos blancos de muestra de suelo como se describe en el numeral 3.2.1.
- Soluciones estándares: Se preparan dos soluciones estándares como se describe en el numeral 3.2.2 (Figura 2).
- Muestras Reales: Se escogieron las muestras de suelo del municipio de San Vicente de Chucurí donde  $M_1$  esta en el rango de 0.3-0.5 mg/L y  $M_2$  entre 0.9-1.3 mg/L, para evaluar todo el rango de validación el cual fue hasta 1,5 mg Cd/L.
- Muestras adicionadas: A  $M_1$  y  $M_2$  se adicionó 0.01 mg de cadmio. Ver Figura 2.

### **3.2.5 Descripción de soluciones y muestras para plomo total en suelos**

- La solución testigo se preparó adicionando todos los reactivos a dos blancos de muestras de suelo más  $4 \times 10^{-3}$  mg/L de solución de plomo correspondiente al límite de detección instrumental. La solución testigo se sometió al mismo procedimiento analítico de las muestras.
- Soluciones estándares: Como el límite de detección superior fue de 15 mg/L quedó  $C_1$  de 1.35mg/L y  $C_2$  de 13.5mg/L.
- Muestras Reales: Se escogieron muestras de suelos con concentraciones alta  $M_2$  y baja  $M_1$ . La muestra  $M_1$  tiene un valor cercano a 5 mg/L y  $M_2$  oscila entre 8-10 mg/L.

- Muestras adicionadas: A las masas  $M_1$  y  $M_2$  se adicionó 0.2 mg de plomo. La figura 3 muestra la región en donde se deben ubicar las soluciones.

**Figura 3. Diagrama de la ubicación de las soluciones de trabajo en la curva de calibración para la determinación de plomo total y disponible en suelo.**



### 3.2.6 Descripción de soluciones y muestras para plomo disponible en suelos

- La solución testigo se preparó adicionando todos los reactivos a un blanco de muestra de suelo como se describe en el numeral 3.2.5.
- Soluciones estándares: Se prepararon dos estándares en solución de DTPA;  $C_1$  de 1.35mg/L y  $C_2$  de 13.5mg/L. (Ver Figura 3)
- Muestras Reales: Se escogieron muestras de suelo para  $M_1$  y  $M_2$ , y se realizaron como se describe en el numeral 3.2.5.
- Muestras adicionadas: A las masas  $M_1$  y  $M_2$  se adicionó 0.05 mg y 0.08 mg de plomo.

### 3.2.7 Cálculo de las figuras de mérito a partir del diseño experimental

A partir del diseño experimental se calculan las siguientes figuras de mérito, para cada método.

3.2.7.1 Límite de detección. Con los datos de B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> se determinó el límite de detección calculando la desviación estándar y aplicando la ecuación 4.

$$LD = \bar{X} + 3SD \quad (4)$$

Donde  $\bar{X}$  es el valor medio de las determinaciones y  $SD$  es la desviación estándar de las medidas.

3.2.7.2 El límite de cuantificación. Con el valor medio y desviación estándar de las medidas usadas en el cálculo del límite de detección se calculó el límite de cuantificación utilizando la ecuación 5.

$$LC = \bar{X} + 10SD \quad (5)$$

Donde  $\bar{X}$  es el valor medio de las determinaciones y  $SD$  es la desviación estándar.

3.2.7.3 Sensibilidad del método. La sensibilidad del método se determinó mediante el cálculo de la pendiente de la recta de mínimos cuadrados, construida en el rango lineal establecido anteriormente.

3.2.7.4 Precisión. Se estimó mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido de M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>.

3.2.7.5 Exactitud. Se calculó el porcentaje de recuperación para los adicionados de alto y bajo rango empleando la ecuación 6.

$$\% \text{Rec.A.} = \frac{\text{mg\_de\_Cd\_detectados}}{\text{mg\_de\_Cd\_adicionados}} \times 100 \quad (6)$$

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y CENIZA DE CACAO FRESCO Y FERMENTADO

Los parámetros de humedad se hacen necesarios para reportar el valor del análisis de estudio en peso seco y el porcentaje de ceniza indica la cantidad de minerales que contiene las muestras de cacao en estudio. En los reportes literarios solo se presentan estos porcentajes con respecto a cacao fermentado donde los porcentajes de humedad están entre 5.7 cercanos a los reportados, los porcentajes de ceniza presentan mayor variación sin embargo sus valores son igualmente cercanos a los reportados. El cacao fresco es una nueva matriz de estudio de importancia como referencia para próximas investigaciones.

**Tabla 5 Valores de humedad y ceniza de las muestras de cacao fresco.**

<b>CACAO FRESCO</b>					
<b>FINCA</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
%	MEZCLA 1	33.80	34.6	32.65	34.90
	MEZCLA 2	35.02	34.80	33.01	34.89
	MEZCLA 3	34.20	35	32.89	35.00
<b>PROMEDIO</b>		<b>34.34</b>	<b>34.90</b>	<b>32.85</b>	<b>34.93</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>		<b>0.49</b>	<b>0.1</b>	<b>0.183</b>	<b>0.06</b>
%	MEZCLA 1	3.38	3.35	3.20	3.39
	MEZCLA 2	3.50	3.66	3.17	3.42
	MEZCLA 3	3.68	3.67	3.23	3.39
<b>PROMEDIO</b>		<b>3.52</b>	<b>3.56</b>	<b>3.20</b>	<b>3.40</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>		<b>0.15</b>	<b>0.18</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>

**Tabla 6 Valores de humedad y ceniza de las muestras de cacao fermentado.**

<b>CACAO FERMENTADO</b>				
<b>FINCA</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
% HUMEDAD	MEZCLA 1	5.82	5.64	5.81
	MEZCLA 2	5.81	5.79	5.67
	MEZCLA 3	5.85	5.83	5.61
<b>PROMEDIO</b>		<b>5.82</b>	<b>5.75</b>	<b>5.70</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>		<b>0.021</b>	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>
REPORTE EN LITERATURA <sup>[48]</sup>	CRIOLLO	5.20		
	FORASTERO	4.50		
% CENIZA	MEZCLA 1	3.20	3.41	2.95
	MEZCLA 2	3.23	3.53	2.93
	MEZCLA 3	3.25	3.52	3.00
<b>PROMEDIO</b>		<b>3.23</b>	<b>3.49</b>	<b>2.96</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>		<b>0.03</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>
REPORTE EN LITERATURA <sup>[48]</sup>	CRIOLLO	3.21		
	FORASTERO	3.20		

## **4.2 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO EN CACAO FERMENTADO**

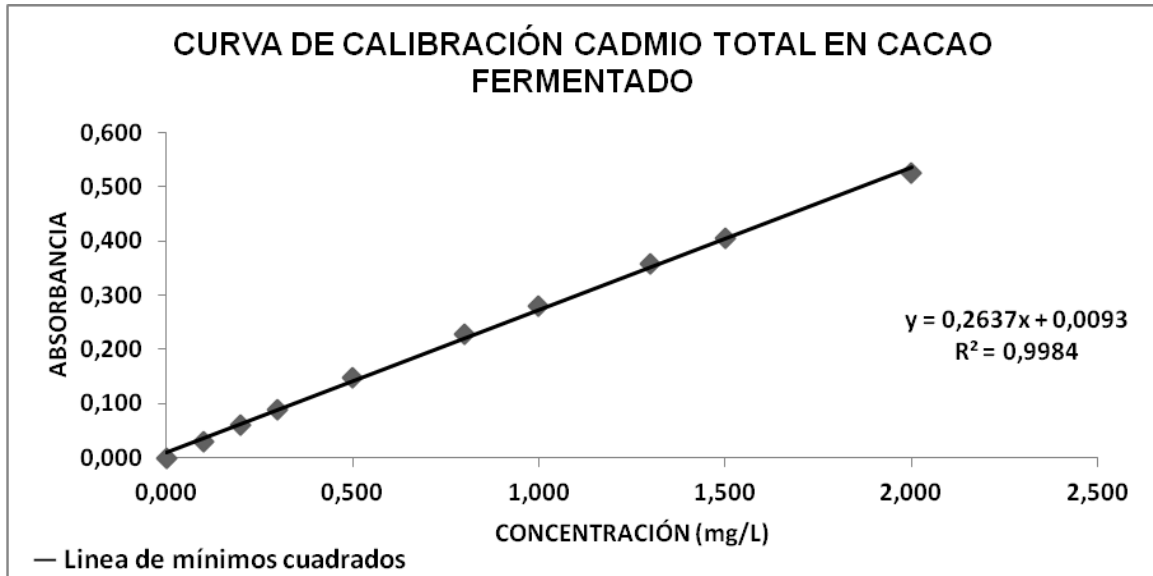
**4.2.1. Curva de calibración.** En esta etapa del proyecto se realizó la construcción de la curva de calibración midiendo durante 6 días las soluciones patrones de la curva de calibración. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7. Lecturas de absorbancia realizadas a los patrones de curva de calibración de cadmio para determinación de cacao fermentado.**

<b>Patrón [mg/L]</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desvest</b>
<b>0</b>	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>
<b>0.100</b>	0.029	0.030	0.031	0.032	0.028	0.027	<b>0.030</b>	<b>0.002</b>
<b>0.200</b>	0.062	0.059	0.063	0.067	0.057	0.055	<b>0.061</b>	<b>0.004</b>
<b>0.300</b>	0.092	0.088	0.091	0.097	0.084	0.082	<b>0.089</b>	<b>0.006</b>
<b>0.500</b>	0.154	0.143	0.149	0.159	0.140	0.137	<b>0.147</b>	<b>0.009</b>
<b>0.800</b>	0.239	0.225	0.230	0.247	0.218	0.212	<b>0.229</b>	<b>0.013</b>
<b>1.000</b>	0.295	0.275	0.283	0.301	0.266	0.264	<b>0.281</b>	<b>0.015</b>
<b>1.300</b>	0.368	0.349	0.362	0.387	0.342	0.336	<b>0.357</b>	<b>0.019</b>
<b>1.500</b>	0.419	0.387	0.409	0.429	0.392	0.390	<b>0.405</b>	<b>0.017</b>
<b>2.000</b>	0.534	0.525	0.529	0.545	0.507	0.509	<b>0.525</b>	<b>0.015</b>
<b>R</b>	0.998	0.998	0.999	0.998	0.998	0.999	<b>0.998</b>	<b>0.001</b>
<b>M</b>	0.280	0.269	0.272	0.288	0.261	0.259	<b>0.263</b>	<b>0.010</b>
<b>B</b>	<b>0.008</b>	<b>0.008</b>	<b>0.004</b>	<b>0.003</b>	<b>0.004</b>	<b>0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>0.003</b>

Con el promedio de los valores de absorbancia para cada patrón se construyó la curva de calibración de cadmio como se muestra en la figura 4.

**Figura 4. Curva de calibración de cadmio en cacao fermentado.**



Se definió el intervalo de validación entre 0.1 mg/L y 2.0 mg/L de cadmio, apoyados en el estudio presentado en la tabla 8 en donde se observa un coeficiente de correlación de 0.998 para la curva construida con los promedios de los 6 días (figura 4). Esto nos muestra una correlación lineal directa entre la concentración y la absorbancia en el rango evaluado.

4.2.2 Linealidad. Se realizó la prueba  $t$  a la recta de mínimos cuadrados de la curva de calibración para verificar la linealidad en el intervalo de la curva. Basados en la hipótesis nula: No existe correlación entre X y Y.

$$t_{cal} = 41.77 \quad \text{reemplazando en la ecuación 3, con } n = 9.$$

$$t_{tab} = 2.31 \quad \text{Con un 95\% de confianza y 8 grados de libertad.}$$

Como  $t_{cal} > t_{tab}$  la hipótesis se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa entre X y Y.

4.2.3 Diseño experimental. Dentro del desarrollo metodológico para la determinación de cadmio en cacao fermentado es necesario evaluar el comportamiento de soluciones de trabajo descritas en el numeral 3.2.1, dentro del intervalo de validación del método. Para esto se realizó la medición de las soluciones de trabajo durante 6 días.

**Tabla 8. Concentración encontrada en las diversas soluciones de trabajo durante 6 días para cadmio en cacao fermentado.**

Día	Concentración en mg/L				Concentración en mg/Kg			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub>
<b>Día1</b>	0,074	0,069	0,181	1,741	5.044	7.783	7.201	8.883
<b>Día 2</b>	0,062	0,063	0,176	1,708	5.033	7.563	7.174	8.999
<b>Día 3</b>	0.073	0,070	0,176	1,731	5.054	7.747	7.253	8.901
<b>Día 4</b>	0,071	0,067	0.188	1,743	5.222	7.771	7.184	8.980
<b>Día 5</b>	0,067	0,068	0,179	1,747	5.129	7.711	7.159	8.956
<b>Día 6</b>	0,062	0,069	0,182	1,765	5.214	7.845	7.110	8.852
<b>Media</b>	0.068		0.180	1.739	5.116	7.737	7.180	8.929
<b>Desvest</b>	0.004		0.005	0.019	0.086	0.091	0.047	0.058
<b>%CV</b>	6.093		2.496	1.086	1.681	1.180	0.689	0.654

Para las soluciones B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> el valor reportado corresponde a la concentración detectada por el equipo sobre las soluciones aforadas a 100 mL. Para las soluciones M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>+A<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>+A<sub>2</sub> el valor reportado corresponde a la concentración de cadmio de la muestra de cacao fermentado de la finca uno y sus adicionados soluciones igualmente aforadas a 100 mL. Los 6 lotes presentan bajas desviaciones estándar y bajos coeficientes de variación indicando una baja variabilidad en las medidas ver (tabla 8). Se deduce que los datos obtenidos son uniformes y que la dispersión es baja. La tabla 8 muestra que las soluciones de más baja concentración (excepto los blancos) presentan %CV más altos indicando

que el método es más sensible en la lectura de absorbancia de soluciones con concentración alta.

4.2.3.1 El límite de detección del método (LDM). El límite de detección del método se calculó con la ecuación 4 y las lecturas de los blancos reportados en la tabla 8.

$$LDM = 0.533mg / Kg$$

4.2.3.2 El límite de cuantificación del método. El límite de cuantificación del método se calculó con la ecuación 5 y las lecturas de los blancos de la tabla 8.

$$LC = 0.720mg / Kg$$

4.2.3.3 Sensibilidad del método. La tabla 7 muestra los valores de las pendientes de las rectas de mínimos cuadrados obtenidas de las lecturas realizadas durante los 6 días de la validación, la sensibilidad se estimó como el promedio de estas pendientes.

Sensibilidad = 0.263 mg/L.

Este valor indica que una variación en la concentración de 0.263 mg/L o más será detectada por el equipo y generará un valor de absorbancia diferente.

4.2.3.4 Precisión. La precisión se evaluó en términos del porcentaje del coeficiente de variación para los patrones y las muestras analizadas en sectores bajos y altos del rango de validación. La tabla 8 muestra los %CV para los cuatro grupos de muestras analizados durante los 6 días.

Se observa que  $C_1$  y  $M_1$  presentan %CV más altos que  $C_2$  y  $M_2$ , esto nos indica que la técnica es más precisa para el análisis de soluciones ubicadas en sectores altos de la curva. Las soluciones ubicadas en el sector bajo de la curva podrán ser cuantificadas pero con una mayor variabilidad en la medida. En términos

generales se acepta el valor del %CV reportado, puesto que se considera como aceptable %CV inferiores al 10 %, según lo indica la literatura [39].

4.2.3.5 Exactitud. La exactitud se evaluó en términos del porcentaje de recuperación para los adicionados en la región de baja concentración y en la región de alta concentración. La tabla 8 muestra los valores de concentración en mg/kg para cada uno de los adicionados, a continuación se muestran los cálculos realizados para evaluar el porcentaje de recuperación.

- **Región de baja concentración:  $M_1 + A_1$ .** Como se indicó en la metodología numeral 3.2.1.  $A_1 = 0.02$  mg que corresponde a los mg de cadmio adicionados. Para calcular los mg de cadmio detectados se restó a cada a valor de  $M_1+A_1$  el promedio de  $M_1$  obtenidos de la tabla 8, el resultado se multiplicó por la cantidad pesada que se muestra en la tabla 9. El porcentaje de recuperación se halló aplicando la ecuación 6.

**Tabla 9. Cálculo del porcentaje de recuperación a rango bajo para determinación de cadmio en cacao fermentado.**

Día	Masa muestra $1 \times 10^{-3}$ (kg)	$M_1+A_1$ (mg/kg)	$((M_1+A_1)-5.116) \times \text{Masa}$ (mg)	%Rec. $A_1$ .
Día 1	9.42	7.20	$1.96 \times 10^{-2}$	98.00
Día 2	9.42	7.17	$1.94 \times 10^{-2}$	97.00
Día 3	9.42	7.25	$2.01 \times 10^{-2}$	100.50
Día 4	9.42	7.18	$1.95 \times 10^{-2}$	97.00
Día 5	9.42	7.16	$1.92 \times 10^{-2}$	96.00
Día 6	9.42	7.11	$1.88 \times 10^{-2}$	94.00
Promedio	9.42	7.18	$1.99 \times 10^{-2}$	97.08

Se observa que el promedio del porcentaje de recuperación es 97.08%, este valor se acepta ya que los porcentajes de recuperación deben oscilar entre el 95% y el

105%. Como criterio de aceptación de la exactitud de un método, según la guía del Instituto Nacional de Salud [38].

- **Región de alta concentración:  $M_2 + A_2$ .** De igual forma que para el adicionado  $A_1$  en el cálculo del porcentaje de recuperación de  $A_2$  se evaluó la cantidad del adicionado que fue recuperada por el método, los datos para el cálculo se muestran en la tabla 8 para una cantidad adicionada de  $A_2$  (0.02 mg) mostrada en el numeral 3.2.1 de la metodología.

**Tabla 10. Cálculo del porcentaje de recuperación de rango alto para la determinación de cadmio en cacao fermentado.**

Día	Masa de muestra $1 \times 10^{-2}$ (kg)	$M_2 + A_2$ (mg/kg)	$((M_2 + A_2) - 7.737) * \text{Masa}$ $1 \times 10^{-2}$ (mg)	%Rec. $A_2$ .
Día 1	1.64	8.88	1.88	94.00
Día 2	1.64	8.99	2.08	103.0
Día 3	1.64	8.90	1.91	95.30
Día 4	1.64	8.98	2.04	102.0
Día 5	1.64	8.96	1.99	99.80
Día 6	1.64	8.85	1.83	91.30
Promedio	1.64	8.93	1.96	97.60

La tabla 10 muestra claramente que el método es exacto para la cuantificación de cadmio en concentraciones altas. El porcentaje de recuperación fue mayor para las determinaciones realizadas en muestras con altas concentraciones del metal lo cual indica que las muestras analizadas en el sector superior de la curva de calibración presentan menor variabilidad en la medida y una mayor exactitud en el valor reportado.

#### 4.3 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO EN CACAO FRESCO

4.3.1 Curva de calibración. Siguiendo el análisis de los resultados presentados en el numeral 4.2. Se obtuvo los siguientes parámetros que establecen una

correlación lineal directa entre la concentración y la absorbancia en el rango evaluado (ver anexo B).

<b>Intervalo de validación de Cadmio</b>	0.1-1.5 mg/L (ver Anexo B, Tabla 1)	
<b>Coeficiente de correlación</b>	0.999 (ver Anexo B, Figura 1)	
<b>Desviaciones estándar</b>	< 0.05 para concentraciones menores a 0.08mg/L.	
<b>Linealidad</b>	$t_{cal} = 49.96$	$t_{tab}=2.31$

4.3.2 Diseño experimental. Se realizó la determinación de cadmio total en cacao fresco en las soluciones de trabajo durante 6 días. Los datos se muestran en la tabla 2 (ver anexo B). Los 6 lotes presentan bajas desviaciones estándar y bajos coeficientes de variación indicando una baja variabilidad en las medidas, se deduce que los datos obtenidos son uniformes y que la dispersión es baja al evaluar la precisión y la exactitud de la metodología. La tabla 2 muestra que las soluciones de más baja concentración (excepto los blancos) presentan %CV más altos indicando que el método es más sensible en la lectura de absorbancia de soluciones con concentración alta.

<b>El límite de detección del método (LDM)</b>		0.547 mg/Kg
<b>El límite de cuantificación del método (LC)</b>		0.733 mg/Kg
<b>Sensibilidad del método</b>		0.177 mg/L
<b>Precisión: porcentaje coeficiente de variación (%CV)</b>	%CV M1	2.534
	%CV M2	1.027

4.3.3 Exactitud. La exactitud se evaluó en términos del porcentaje de recuperación para los adicionados en la región de baja concentración y en la región de alta concentración. La tabla 2 muestra los valores de concentración en mg/kg para

cada uno de los adicionados, a continuación se muestran los cálculos realizados para evaluar el porcentaje de recuperación.

Como se indicó en la metodología numeral 3.2.2,  $A_1 = 0.02$  mg que corresponde a los mg de cadmio adicionados. El porcentaje de recuperación se halló aplicando la ecuación 6. Los resultados se muestran en la tabla 3 para la región de baja concentración  $M_1 + A_1$  (ver anexo B). Para la región de alta concentración la cantidad adicionada de  $A_2$  fue de 0.03 mg y los resultados se presentan en la tabla 4 (ver anexo B).

<b>Región de baja concentración: <math>M_1 + A_1</math></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 97.50%
<b>Región de alta concentración: <math>M_2 + A_2</math></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 98.30%

#### 4.4 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO TOTAL EN SUELO

4.4.1 Curva de calibración. Siguiendo el análisis de los resultados presentados en el numeral 4.2. Se obtuvieron los siguientes parámetros que establecen una correlación lineal directa entre la concentración y la absorbancia en el rango evaluado (ver anexo C).

<b>Intervalo de validación de Cadmio</b>	0.1-1.5 mg/L (ver anexo C, Tabla 1)	
<b>Coeficiente de correlación</b>	0.999 (ver anexo C, Figura 1)	
<b>Desviaciones estándar</b>	Valores entre 0.008 a 0.08, aumentan proporcionalmente con la concentración.	
<b>Linealidad</b>	$t_{cal} = 49.96$	$t_{tab} = 2.31$

4.4.2 Diseño experimental. Dentro del desarrollo metodológico para la determinación de cadmio total en suelo es necesario evaluar el comportamiento de

soluciones de trabajo descritas en el numeral 3.2.3, dentro del intervalo de validación del método. Para esto se realizó la medición de las soluciones de trabajo durante 6 días. La tabla 2 (ver anexo C) indica que las soluciones de más baja concentración (excepto los blancos) presentan %CV más altos demostrando que el método es más sensible en la lectura de absorbancia de soluciones con concentración alta.

<b>El límite de detección del método (LDM)</b>		1.54 mg/Kg
<b>El límite de cuantificación del método (LD)</b>		2.00 mg/Kg
<b>Sensibilidad del método</b>		0.170 mg/L
<b>Precisión: porcentaje coeficiente de variación (%CV)</b>	%CV M1	3.480
	%CV M2	1.180

4.4.3 Exactitud. La exactitud se evaluó en términos del porcentaje de recuperación para los adicionados en la región de baja concentración y en la región de alta concentración. La tabla 2 del anexo C muestra los valores de concentración en mg/kg para cada uno de los adicionados.

Como se indicó en la metodología numeral 2.2.6. A1 y A2 equivalen a 0.01 mg que corresponde a los mg de cadmio adicionados. Los mg de cadmio detectados y los porcentajes de recuperación se presentan en la tabla 3 (ver anexo B) para la región de baja concentración y para la de alta concentración en la tabla 4 (ver anexo C).

<b>Región de baja concentración: M1 + A<sub>1</sub></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 96.70%
<b>Región de alta concentración: M<sub>2</sub> + A<sub>2</sub></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 98.24%

## 4.5 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO DISPONIBLE EN SUELO

4.5.1. Curva de calibración. En esta etapa del proyecto se realizó la construcción de la curva de calibración midiendo durante 6 días las soluciones patrones de la curva de calibración. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 1 (ver anexo D). Esto demuestra una correlación lineal directa entre la concentración y la absorbancia en el rango evaluado.

<b>Intervalo de validación de Cadmio</b>	0.1-1.5 mg/L (ver anexo D, Tabla 1)	
<b>Coefficiente de correlación</b>	0.999 (ver anexo D, Figura 1)	
<b>Desviaciones estándar</b>	Valores de 0.003 a 0.035, aumenta proporcionalmente con la concentración.	
<b>Linealidad</b>	$t_{cal} = 49.96$	$t_{tab} = 2.31$

4.5.2 Diseño experimental. Dentro del desarrollo metodológico para la determinación de disponibilidad de cadmio en suelo es necesario evaluar el comportamiento de soluciones de trabajo descritas en el numeral 3.2.4 dentro del intervalo de validación del método. Para esto se realizó la medición de las soluciones de trabajo durante 6 días. Los 6 lotes presentan bajas desviaciones estándar y bajos coeficientes de variación indicando una baja variación en las medidas. Se deduce que los datos obtenidos son uniformes y que la dispersión es baja. La tabla 2 (ver anexo D) indica que las soluciones de más baja concentración (excepto los blancos) presentan %CV más altos demostrando que el método es más sensible en la lectura de absorbancia de soluciones con concentración alta.

<b>El límite de detección del método (LDM)</b>	0.160 mg/Kg	
<b>El límite de cuantificación del método (LD)</b>	0.216 mg/Kg	
<b>Sensibilidad del método</b>	0.140 mg/L	
<b>Precisión: porcentaje coeficiente de variación (%CV)</b>	%CV M1	3.450
	%CV M2	1.914

4.5.3 Exactitud. La exactitud se evaluó en términos del porcentaje de recuperación para los adicionados en la región de baja concentración y en la región de alta concentración. La tabla 2 (ver anexo D), muestra los valores de concentración en mg/kg para cada uno de los adicionados.

Como se indicó en la metodología numeral 3.2.4  $A_1$  y  $A_2$  equivalen a 0.01 mg de cadmio adicionados. En la tabla 3 (ver anexo D) se presentan los mg de cadmio detectados y sus correspondientes porcentajes de recuperación para la región de baja concentración. En la tabla 4 (ver anexo D) se presentan estos valores para región de alta concentración.

<b>Región de baja concentración: <math>M_1 + A_1</math></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 98.20%
<b>Región de alta concentración: <math>M_2 + A_2</math></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 95.30%

#### 4.6 DETERMINACIÓN DE PLOMO TOTAL EN SUELO

4.6.1 Curva de calibración. Durante los 6 días que duró el experimento se midieron los patrones de la curva de calibración. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 1 (ver anexo E).

<b>Intervalo de validación de plomo</b>	1.00 – 15.00 mg/L (ver anexo E, Tabla 1)	
<b>Coefficiente de correlación</b>	0.999 (ver anexo E, Figura 1)	
<b>Desviaciones estándar</b>	Valores de 0.005 a 0.078, aumenta proporcionalmente con la concentración.	
<b>Linealidad</b>	$t_{cal} = 49.96$	$t_{tab} = 2.31$

4.6.2 Diseño experimental. Se realizó la determinación de plomo total en suelo en las soluciones de trabajo durante 6 días. Los datos se muestran en la tabla 2 (ver anexo E). Los 6 lotes presentan bajas desviaciones estándar y bajos coeficientes de variación indicando una baja variabilidad en las medidas, se deduce que los

datos obtenidos son uniformes y que la dispersión es baja. La tabla 2 muestra que las soluciones (excepto los blancos) presentan similares %CV, no se puede discriminar la sensibilidad en la lectura de absorbancia de éstas soluciones, sin embargo para las soluciones  $M_2+A_2$  se presenta un %CV bajo que indica una alta sensibilidad.

<b>El límite de detección del método (LDM)</b>		1.64 mg/Kg
<b>El límite de cuantificación del método (LD)</b>		2.34 mg/Kg
<b>Sensibilidad del método</b>		0.03 mg/L
<b>Precisión: porcentaje coeficiente de variación (%CV)</b>	%CV M1	1.866
	%CV M2	1.864

**4.6.3 Exactitud.** La exactitud se evaluó en términos del porcentaje de recuperación para los adicionados en la región de baja concentración y en la región de alta concentración. La tabla 2 muestra los valores de concentración en mg/kg para cada uno de los adicionados.

Como se indicó en la metodología numeral 3.2.5  $A_1$  y  $A_2$  equivalen a 0.20 mg de plomo adicionados. En la tabla 3 (ver anexo E) se presentan los mg de plomo detectados y sus correspondientes porcentajes de recuperación para la región de baja concentración. En la tabla 4 (ver anexo E) se presentan estos valores para región de alta concentración.

<b>Región de baja concentración: <math>M_1 + A_1</math></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 98.36%
<b>Región de alta concentración: <math>M_2 + A_2</math></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 96.50%

## 4.7 DETERMINACIÓN DE PLOMO DISPONIBLE EN SUELO

4.7.1 Curva de calibración. Durante los 6 días que duró el experimento se midieron los patrones de la curva de calibración. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 1 (ver anexo F).

<b>Intervalo de validación de plomo</b>	1.00 – 15.00 mg/L (ver anexo F, Tabla 1)	
<b>Coefficiente de correlación</b>	0.9999 (ver anexo F, Figura 1)	
<b>Desviaciones estándar</b>	Valores de 0.004 a 0.035, aumenta proporcionalmente con la concentración.	
<b>Linealidad</b>	$t_{cal} = 49.96$	$t_{tab} = 2.31$

4.7.2 Diseño experimental. Se realizó la determinación de plomo disponible en suelo en las soluciones de trabajo durante 6 días. Los datos se muestran en la tabla 2 (ver anexo F). Los 6 lotes presentan bajas desviaciones estándar y bajos coeficientes de variación indicando una baja variabilidad en las medidas, se deduce que los datos obtenidos son uniformes y que la dispersión es baja. La tabla 2 muestra que las soluciones de más alta concentración (excepto los blancos) presentan %CV más altos indicando que el método es más sensible en la lectura de absorbancia de soluciones con concentración alta.

<b>El límite de detección del método (LDM)</b>	0.142 mg/Kg	
<b>El límite de cuantificación del método (LD)</b>	0.198 mg/Kg	
<b>Sensibilidad del método</b>	0.022 mg/L	
<b>Precisión: porcentaje coeficiente de variación (%CV)</b>	%CV M1	1.728
	%CV M2	0.992

4.7.3 Exactitud. La exactitud se evaluó en términos del porcentaje de recuperación como se describe en el numeral 4.7.2. La tabla 2 (ver anexo F), muestra los valores de concentración en mg/kg para cada uno de los adicionados.

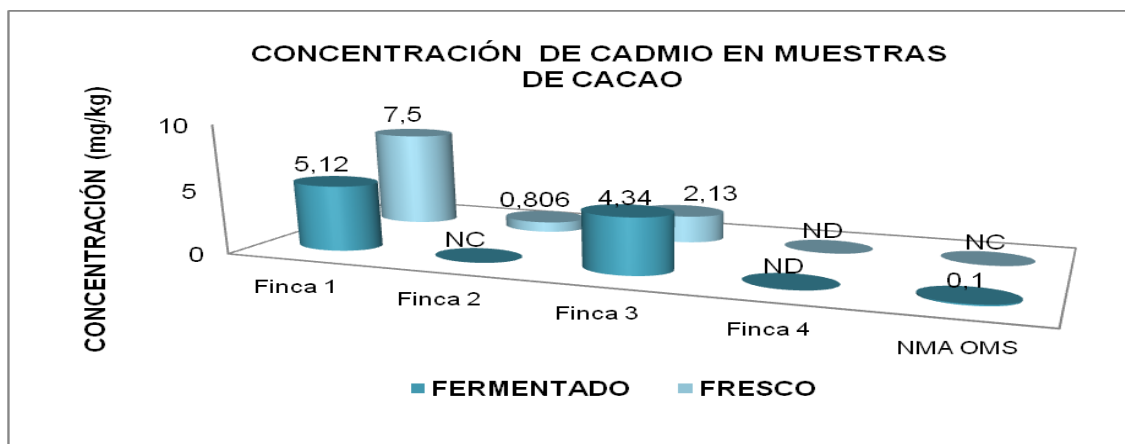
Como se indicó en la metodología numeral 3.2.6  $A_1 = 0.05$  mg de plomo adicionados. En la tabla 3 (ver anexo F) se presentan los mg de plomo detectados y sus correspondientes porcentajes de recuperación para la región de baja concentración. En la tabla 4 (ver anexo F) se presentan estos valores para la región de alta concentración donde  $A_2 = 0.08$  mg de plomo adicionado.

<b>Región de baja concentración: <math>M_1 + A_1</math></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 97.65%
<b>Región de alta concentración: <math>M_2 + A_2</math></b>	El promedio del porcentaje de recuperación 100.7%

#### 4.8 ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

4.8.1 Determinación de cadmio y plomo en muestras de cacao fresco y fermentado. Como se mencionó anteriormente, el muestreo de granos de cacao fresco y fermentado se realizó en tres fincas de la zona de San Vicente de Chucurí. El análisis de las muestras evidenció la presencia de cadmio en las fincas uno, dos y tres, como se observa en la figura 5.

**Figura 5. Concentración de cadmio en muestras de cacao fresco y fermentado en las fincas.**



ND: No Detectado, valor por debajo del límite de detección del método.  
 NC: No conocido. NMA: Nivel Máximo Admisible.

Los resultados señalan que el cacao de estas fincas excede los niveles máximos permitidos de acuerdo con la OMS, el cual es 0.1mg/kg para cadmio en alimentos.

Es interesante comentar que la finca uno tiene un cultivo de cacao con más de 20 años de edad al igual que la finca tres y presentan concentraciones altas de cadmio en los granos de cacao fresco y fermentado. Contrario a esto, la finca cuatro del municipio de Rionegro se caracteriza por tener árboles de cacao jóvenes, menores a 5 años de edad y sus granos presentan valores por debajo del límite de detección del método (LDM) de 0.547 mg/kg. Se puede considerar que los árboles de la región de San Vicente de Chucurí poseen características fitorremediadoras, ya que acumulan el metal con el pasar de los años.

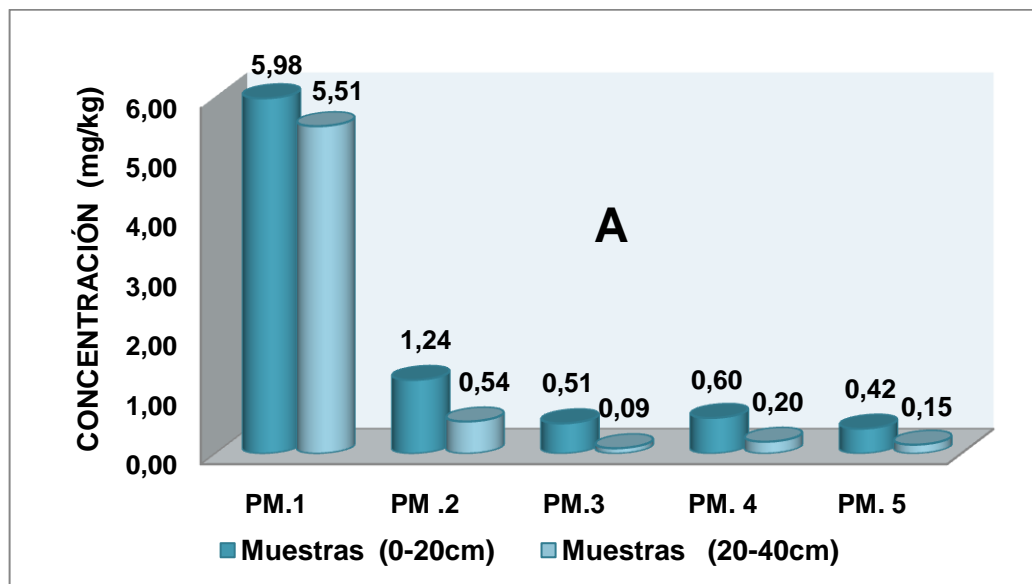
Las plantas en función de su comportamiento ante la presencia de metales en el ambiente pueden clasificarse como acumuladoras porque incrementan activamente metales en sus tejidos [48]. Hay líneas de investigación que analizan las diferencias en la concentración de metales en las distintas partes de los cultivos permitiendo conocer la posible entrada de metales a la cadena trófica, ya que la entrada de metales dependerá de si estos se acumulan en la parte comestible o no de la planta [49].

Se desconoce el proceso de fermentación en cada una de las fincas, sin embargo la concentración del metal puede estar directamente relacionada con el proceso de fermentación y secado, como se indica en la figura 5 para las fincas uno y tres. Una posibilidad existente para explicar la variación de la concentración en el cacao fermentado, se debe a la forma de fermentación que realizan los cultivadores, algunos utilizan el asfalto para secar el cacao. El asfalto por ser un subproducto del petróleo contiene trazas de metales pesados, de esta manera puede intervenir en el aumento de la concentración de los metales pesados en el cacao fermentado.

Por otra parte, no se pudo determinar plomo en ninguna de las muestras de cacao, empleando este método analítico (AOAC 999.11), una de las principales causas de pérdida es la volatilización del plomo en el tratamiento de la muestra, porque se somete en la mufla a períodos prolongados a temperatura 450°C, comprobándose la pérdida de plomo al determinar el límite de detección del método en muestras de cacao fresco y fermentado (muestras enriquecidas), pues todos los valores estuvieron por debajo del límite de detección instrumental de 0.04mg/L.

4.8.2 Determinación de cadmio total en muestras de suelos. En las figuras 6 y 7 se observa la cantidad de cadmio (mg/kg) en el suelo en cada uno de los puntos de muestreo (PM) de acuerdo con la profundidad de las muestras de la finca uno y tres.

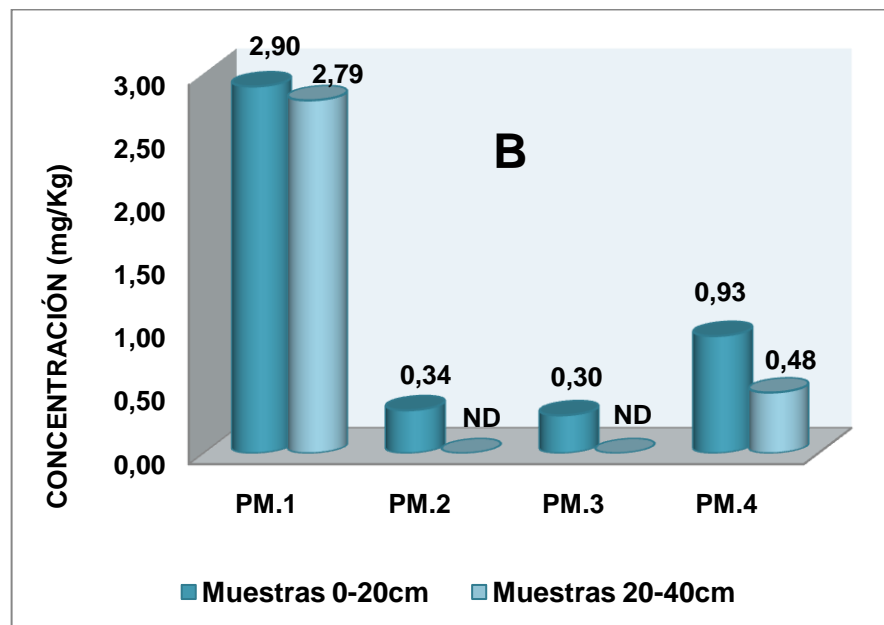
**Figura 6. Cadmio total (A) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca uno.**



P.M: Punto de Muestreo

En la finca uno se encontró gran concentración de cadmio en el suelo en el primer punto de muestreo, se obtuvo un valor de 5,98 mg/kg y 5,51 mg/kg en la capa superior e inferior, respectivamente. Estos valores superan los valores permitidos para suelos agrícolas, la USEPA estableció para cadmio 1mg/kg [50].

**Figura 7. Cadmio total (B) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca tres.**



P.M: Punto de Muestreo

ND: No Detectado, valor por debajo del límite de detección instrumental.

En la figura 7 se observa que la finca tres en general presenta concentraciones de cadmio total menores comparadas con las encontradas en la finca uno, sin embargo en el punto de muestreo uno, la concentración promedio hallada es equivalente a 2.8 mg/kg de cadmio, valor que también supera la cantidad permitida en suelos agrícolas.

Las fincas uno y tres guardan similitud con respecto a la elevada concentración de cadmio total hallado en el primer sitio de muestreo, se presenta uniformidad en los valores de concentración con respecto a su profundidad observándose en las

figuras 6 y 7. Otra característica similar que tienen estas fincas, se evidencia en las capas superiores del suelo que poseen la mayor cantidad del metal con respecto a su capa más profunda.

La tabla 11 registra los promedios de las concentraciones de cadmio total hallados en las muestras de suelo elaboradas por triplicado.

**Tabla 11. Concentraciones de cadmio total (mg/kg) en las diferentes fincas de acuerdo con el punto de muestreo y la profundidad del suelo.**

PROFUNDIDAD DEL SUELO	PUNTO DE MUESTREO	FINCAS DE SANVICENTE DE CHUCURÍ CADMIO TOTAL(mg/Kg)		
		FINCA UNO	FINCA DOS	FINCA TRES
(0-20 cm)	1	5.980	ND	2.900
	2	1.240	ND	0.340
	3	0.510	ND	0.300
	4	0.600	ND	0.927
	5	0.420	ND	NC
(20-40cm)	1 A	5.510	ND	2.793
	2 A	0.540	ND	ND
	3 A	0.090	ND	ND
	4 A	0.200	ND	0.480
	5 A	0.150	ND	NC

ND: No Detectado, valor por debajo del límite de detección instrumental.

Comparando las tres fincas ubicadas en la misma región encontramos que la finca uno presenta los mayores valores de cadmio. Opuesto a este resultado, los valores encontrados en la finca dos, fueron menores al valor del límite de detección instrumental.

Las muestras de suelos de la finca uno fueron analizadas en el Laboratorio Químico de Suelos de la Universidad Industrial de Santander para determinar sus características fisicoquímicas, de los resultados obtenidos se puede resaltar que los suelos se caracterizan por ser arcillosos (52%), ácidos (pH 5) y con altos contenidos de hierro 226 mg/kg en comparación con otros elementos analizados

como azufre 3.10 mg/kg, manganeso 9.68 mg/kg y cobre 1.44 mg/kg (ver anexo G) [50].

Si el alto contenido de hierro se asociara a los óxidos de hierro explicaría la concentración elevada de cadmio en suelo. En la literatura se ha reportado que los óxidos de hierro y manganeso tienen mayor capacidad de absorción de metales pesados en el suelo. Además los óxidos hidratados de hierro y manganeso influyen la solubilidad de cadmio, plomo y cinc en suelos. Por otra parte, la movilidad del cadmio en suelos y su adsorción y distribución depende del pH, el potencial redox, la superficie específica de los coloides, la capacidad de intercambio catiónico el contenido de materia orgánica soluble [51].

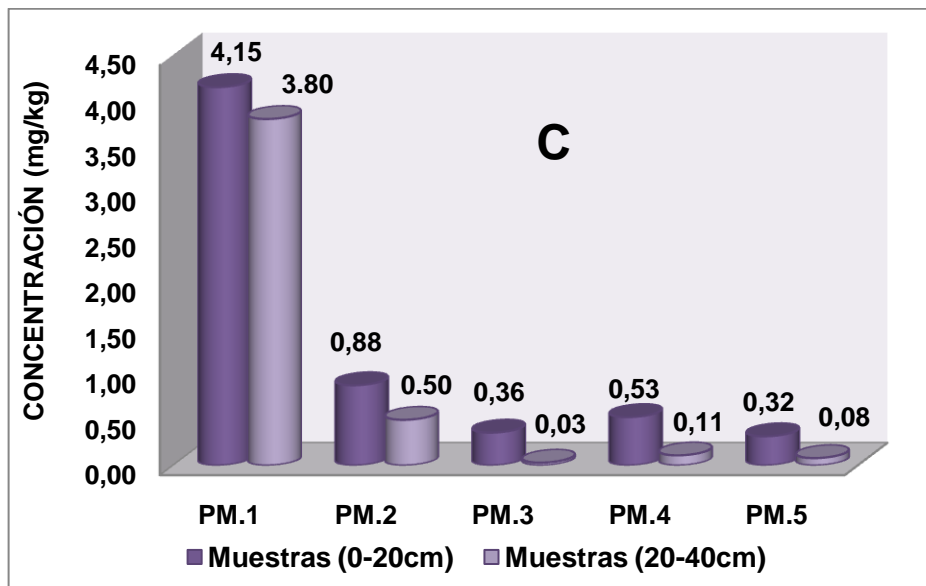
La zona de San Vicente de Chucurí se encuentra localizada sobre una formación sedimentaria carbonácea, la formación del Umir. De acuerdo con un estudio realizado por Ingeominas en la formación del Umir existen mantos de carbón provenientes de procesos de sedimentación uniforme donde el cadmio está presente en altas concentraciones (0.1 y 25 ppm) [50,52]. Por lo tanto es factible que el cadmio presente en los suelos estudiados provenga de fuentes naturales. El cadmio en suelos puede tener origen natural o antropogénico. Las fuentes naturales incluyen rocas, o material aluvial y erosivo transportado por vientos y agua. El cadmio antropogénico en suelos puede provenir de deposición atmosférica, aguas negras, lixiviados, excrementos animales y fertilización con fosfatos. Estos últimos presentan concentraciones de 10 a 200 ppm de cadmio. [53]

La abundancia natural del cadmio en la corteza terrestre está entre 0.1 y 0.9 mg/Kg sin embargo, y dependiendo de muchos factores, se han reportado valores inferiores y superiores. El contenido de cadmio en suelo, por otra parte, aumenta significativamente con la existencia de sulfuros y óxidos de Zinc, Cobre y Plomo

para el caso de las muestras analizadas se cuenta con alto porcentaje de plomo [53].

4.8.3 Determinación de cadmio disponible en muestras de suelos. La determinación de la disponibilidad es fundamental para establecer la cantidad de metal potencialmente asimilable por la planta. En las figuras 8 y 9 se observa la cantidad de cadmio disponible (mg/kg) en el suelo en cada uno de los puntos de muestreo (PM) de acuerdo con la profundidad de las muestras.

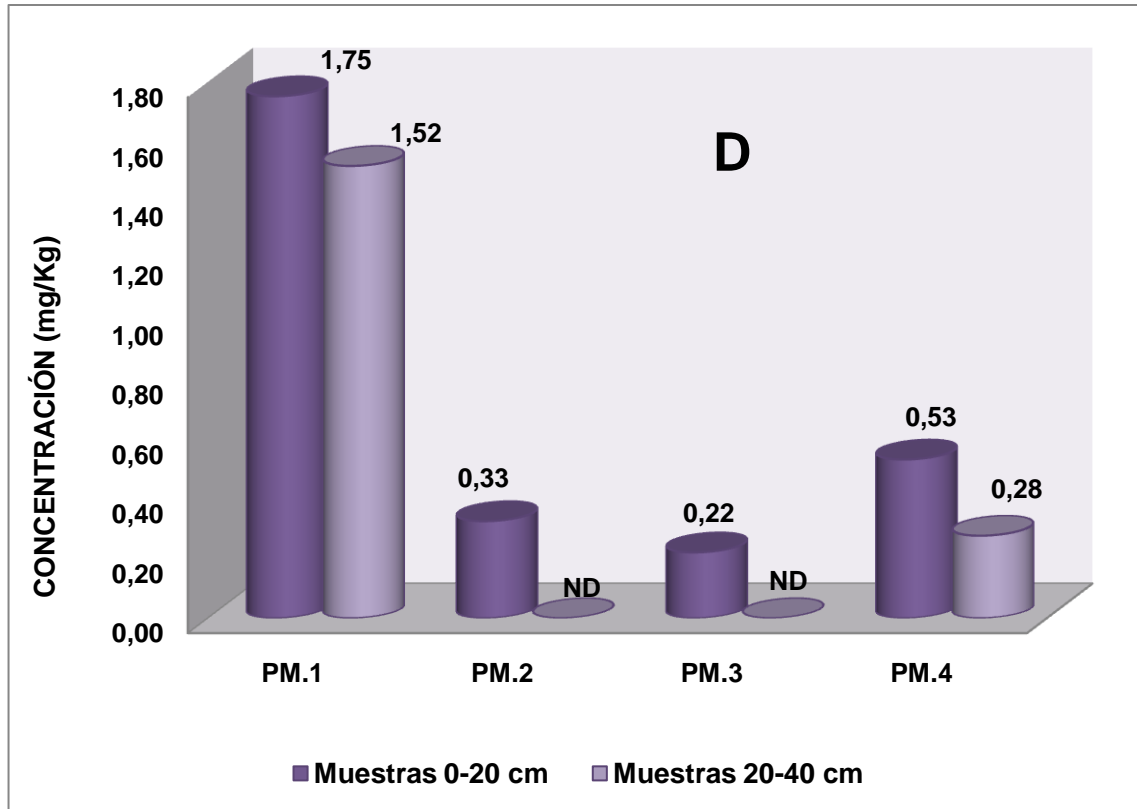
**Figura 8. Cadmio disponible (C) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca uno.**



P.M: Punto de Muestreo

En el caso del cadmio disponible en la finca uno, se encontró mayor concentración del metal en el punto de muestreo uno, con un valor de 4.15 mg/kg correspondiente a la capa superficial del suelo y en el mismo punto de muestreo para la capa más profunda también se encontró alto contenido de cadmio 3.80 mg/kg.

Figura 9. Cadmio disponible (D) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca tres.



P.M: Punto de Muestreo  
ND: No Detectado, valor por debajo del límite de detección instrumental.

De forma similar la finca tres muestra la mayor concentración de cadmio disponible en el punto de muestreo uno con valores de 1.75 mg/kg y 1.52 mg/kg para la primera y segunda capa del suelo. En general, la finca tres presenta menores concentraciones de cadmio disponible en el suelo a comparación de la finca uno y se ve reflejado en las concentraciones obtenidas en cacao (Ver figura 5).

**Tabla 12. Concentraciones de cadmio disponible (mg/kg) en las diferentes fincas de acuerdo con el punto de muestreo y la profundidad del suelo.**

PROFUNDIDAD DEL SUELO	PUNTO DE MUESTREO	FINCAS DE SAN VICENTE DE CHUCURÍ CADMIO DISPONIBLE (mg/Kg)		
		FINCA UNO	FINCA DOS	FINCA TRES
(0-20 cm)	1	4.130	ND	1.753
	2	0.880	ND	0.326
	3	0.360	ND	0.221
	4	0.530	ND	0.533
	5	0.320	ND	NC
(20-40cm)	1 A	3.800	ND	1.519
	2 A	0.500	ND	ND
	3 A	0.030	ND	ND
	4 A	0.110	ND	0.277
	5 A	0.080	ND	NC

En la finca dos no se detectó cadmio disponible, esto se relaciona a la baja concentración de este metal en sus frutos frescos que es de 0.8 mg/Kg con respecto a los valores superiores de las demás fincas. Análogamente a valores de mayor disponibilidad de cadmio en los suelos mayor será la concentración de este elemento en los frutos.

Resulta interesante observar la cantidad de metal disponible en términos del porcentaje de disponibilidad tomando como referencia el valor del metal total, reportado en la sección anterior.

En la tabla 13 se presenta el porcentaje de cadmio disponible presente en las muestras de suelo. Las tendencias observadas demuestran que el cadmio está distribuido uniformemente en el suelo y probablemente su presencia se debe a los procesos de formación de suelos de la región.

**Tabla 13. Porcentaje de disponibilidad de cadmio en suelo de las fincas uno y tres.**

Profundidad del Suelo	Punto de Muestreo	Porcentaje de Disponibilidad Cadmio (%)	
		FINCA UNO	FINCA TRES
<b>0-20cm</b>	1	69.3	60.4
	2	70.1	95.8
	3	70.5	73.6
	4	88.3	57.5
	5	76.2	NC
<b>PROMEDIO</b>		74.8	57.4
<b>20-40cm</b>	1 A	68.9	53.3
	2 A	64.8	ND
	3 A	33.3	ND
	4 A	55.0	57.7
	5 A	53.3	NC
<b>PROMEDIO</b>		55.0	56.0

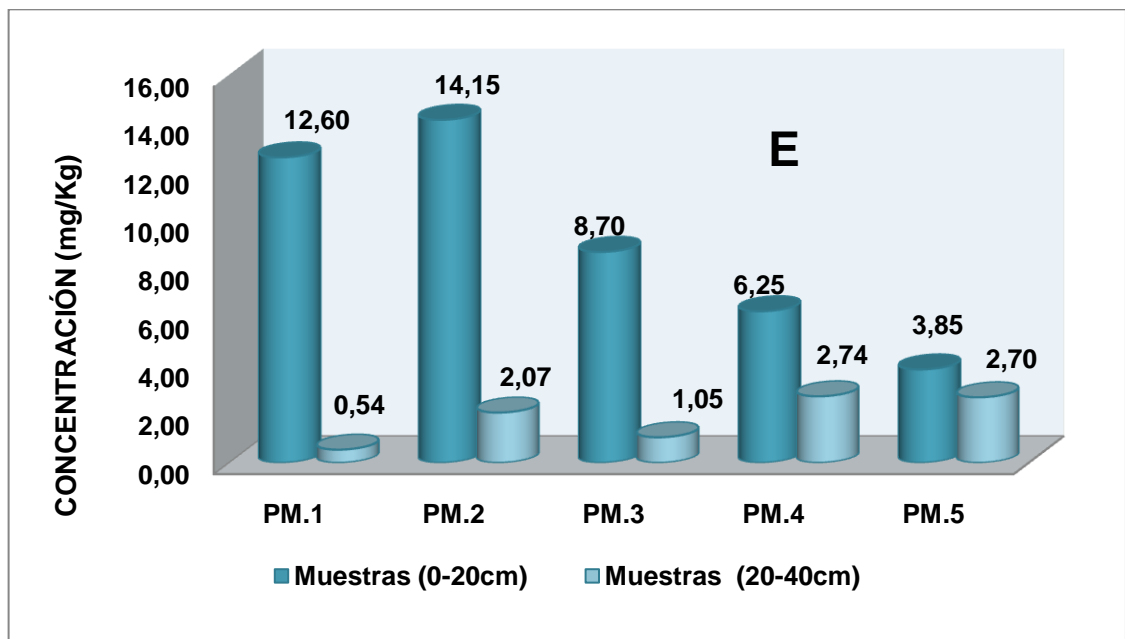
En el suelo los metales se asocian con distintas fracciones: (1) en solución como ion metal libre y complejo metálico soluble, (2) absorbida en los sitios de intercambio de los constituyentes inorgánicos del suelo. Solo los metales asociados a las fracciones 1 y 2 están realmente disponibles para que las plantas lo extraigan. La interacción entre distintos procesos como intercambio catiónico, precipitación, disolución y formación de complejos, afecta la distribución de los metales en el suelo y la fase sólida, siendo responsables de su movilidad y biodisponibilidad [54].

La biodisponibilidad depende de la solubilidad y movilidad de los metales en la solución del suelo, como anteriormente se mencionó los suelos de la finca uno se identifican por ser ácidos, lo que indica la capacidad de solubilizar los metales en la fase sólida del suelo, las muestras también mostraron la tendencia al aumento de la capacidad de intercambio catiónico favoreciendo la acumulación de cadmio en el suelo estos resultados se encuentran publicados en la tesis “Determinación

y validación de cadmio total e intercambiable en algunos suelos cacaoteros del departamento de Santander” [50,55].

4.8.4 Determinación de plomo total en suelos. En las figuras 10 y 11 se observa la concentración de plomo (mg/kg) en el suelo en cada uno de los puntos de muestreo (PM) de acuerdo con la profundidad de las muestras. En la finca uno (figura 10) se encontró mayor concentración de plomo total correspondiente al punto de muestreo dos con un valor de 14.15 mg/kg a profundidad 0-20cm y 2.07 mg/kg a profundidad 20-40cm. De acuerdo con reportes de literatura los niveles permitidos para suelos con fines agrícolas presentan un rango 20-50 mg/kg de plomo [56].

**Figura 10. Plomo total (E) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca uno.**

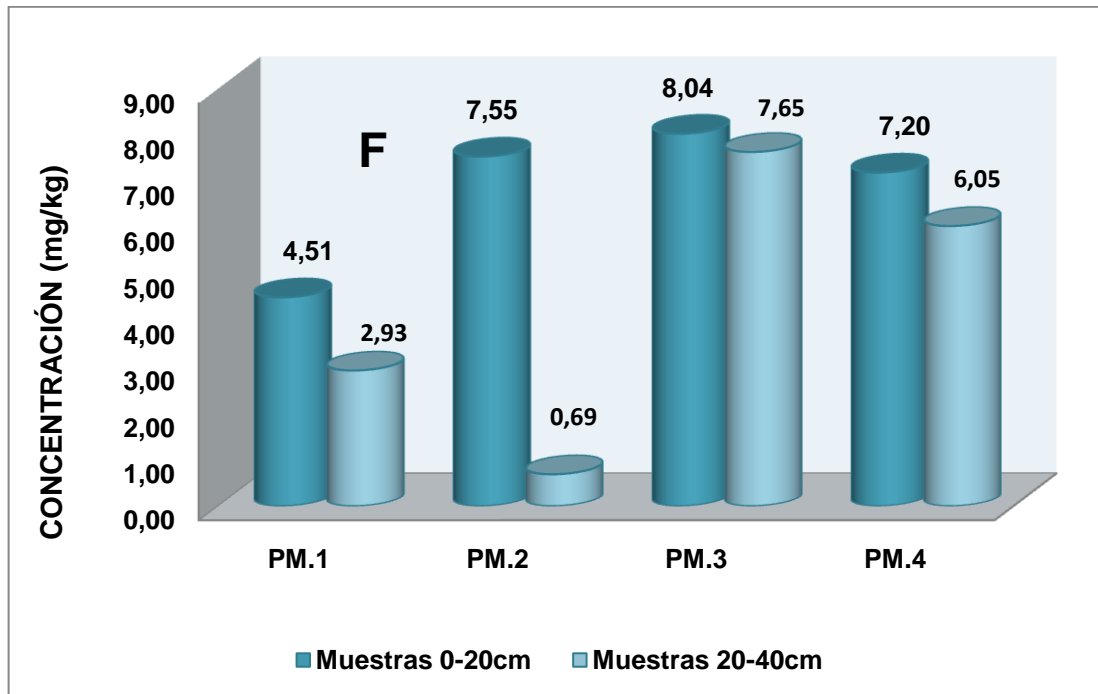


P.M: Punto de Muestreo

En la figura 10 se detalla el contenido de plomo en el suelo, donde las capas superficiales se encuentran en mayor proporción con respecto a las capas

inferiores. Sin embargo para que el metal sea absorbido por la planta es necesario que esté disponible. En la siguiente sección se establecerá el grado de disponibilidad de plomo.

**Figura 11. Plomo total (F) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca tres.**



P.M: Punto de Muestreo

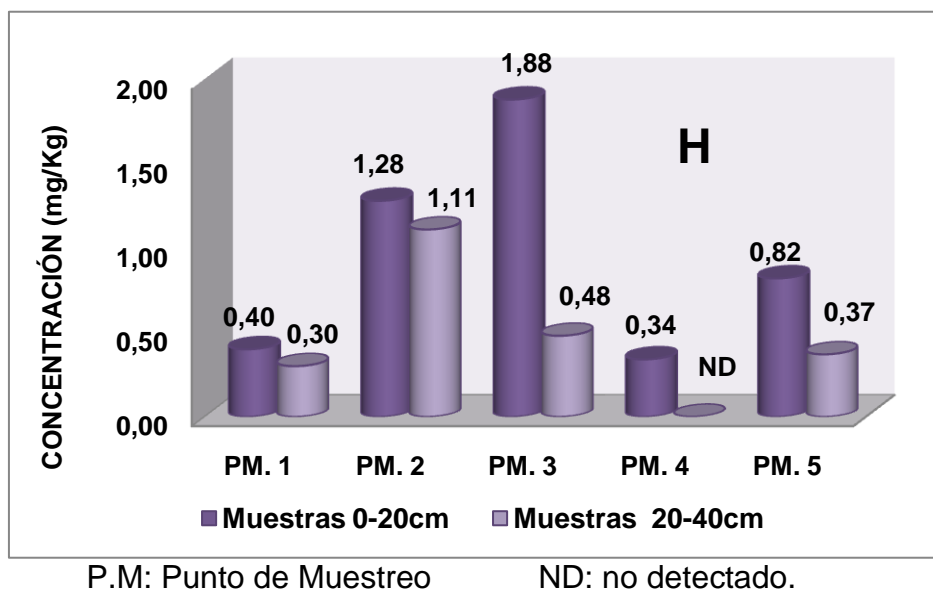
En el análisis de las muestras de la finca tres se presentan en casi todos los puntos de muestreo una concentración similar del metal con un valor promedio de 7.5 mg/kg en la capa superior del suelo y de 6.8 mg/kg para capa inferior del suelo. El punto de muestreo tres mostró mayor concentración de plomo con un valor de 8.0 mg/kg y 7.6 mg/kg en cada capa del suelo (Ver figura 11). Las características edáficas del suelo como lo son el pH, intercambio catiónico, materia orgánica y textura están relacionados con la variabilidad de la concentración de este metal en el suelo. Por lo anterior se puede interpretar que el suelo de esta región no es uniforme.

Tabla 14. Concentraciones de plomo total (mg/kg) en las diferentes fincas de acuerdo con el punto de muestreo y la profundidad del suelo.

PROFUNDIDAD DEL SUELO	PUNTO DE MUESTREO	FINCAS DE SANVICENTE DE CHUCURÍ PLOMO TOTAL(mg/Kg)		
		FINCA UNO	FINCA DOS	FINCA TRES
(0-20 cm)	1	12.600	ND	4.507
	2	14.150	ND	7.547
	3	8.700	ND	8.040
	4	6.250	ND	7.207
	5	3.850	ND	NC
(20-40cm)	1 A	0.540	ND	2.927
	2 A	2.070	ND	0.687
	3 A	1.040	ND	7.647
	4 A	2.740	ND	6.047
	5 A	1.500	ND	NC

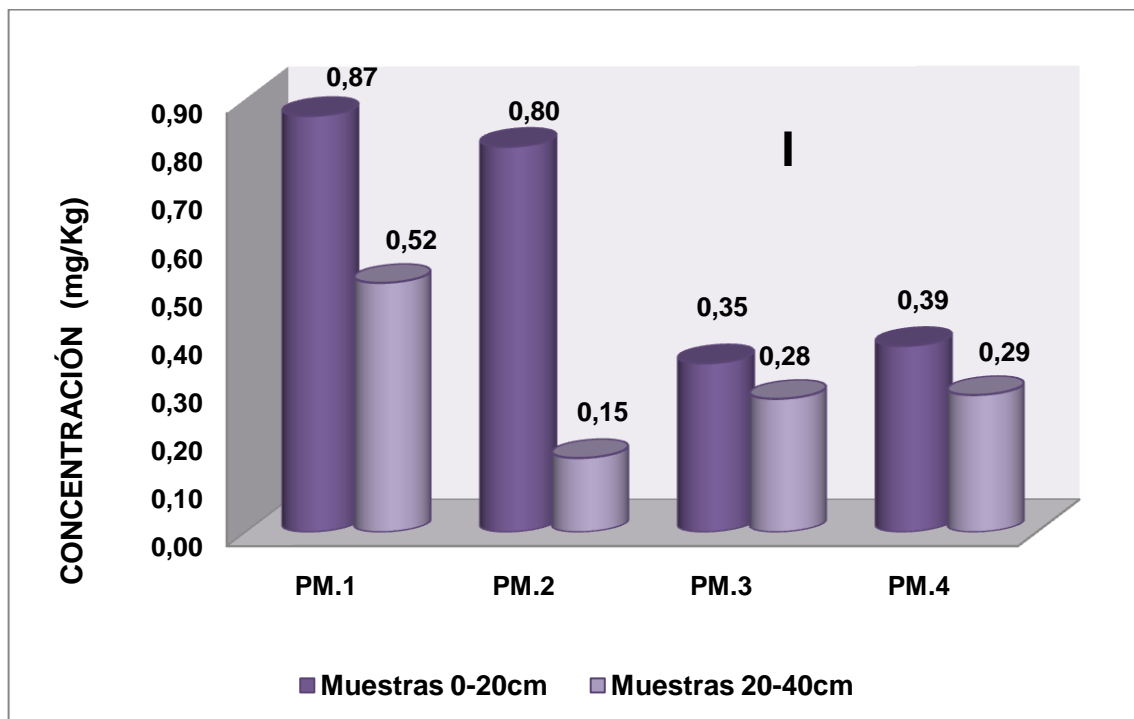
4.8.5 Determinación de plomo disponible en suelos. Como se discutió en la sección anterior, la cuantificación del metal disponible es fundamental para justificar su presencia en la planta. Altos valores de disponibilidad pueden reflejarse en mayores absorciones del contaminante por parte de la planta. En la figura 12 se observa la cantidad de plomo disponible en el suelo en cada uno de los puntos de muestreo (PM) de acuerdo con la profundidad de las muestras.

Figura 12. Plomo disponible (H) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca uno.



En la finca uno se encontró mayor concentración de plomo disponible en el suelo, en el punto de muestreo 3, se obtuvo un valor de 1.88 mg/kg en la capa superficial (Ver figura 12). El plomo disponible presenta igual comportamiento que el plomo total en la primera capa del suelo, es mayor la cantidad de este metal si se compara con la capa inferior. No obstante, los valores de plomo disponible son menores a 2 mg/kg, conociendo que la cantidad disponible del metal es la absorbida por la planta. Es lógico asumir que las concentraciones de plomo en los granos de cacao son mínimas es decir concentraciones en  $\mu\text{g/Kg}$  y para su determinación se requiere de técnicas analíticas como Espectroscopía de Absorción Atómica por Generador de hidruros (GFAAS), Espectroscopia de Absorción Atómica con Horno de Grafito (HGAAS) y Espectroscopía de Masas Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

**Figura 13. Plomo disponible (I) de acuerdo con la profundidad de la muestra de suelo en la finca tres.**



P.M: Punto de Muestreo

ND: no detectado.

El plomo al igual que el cadmio se encuentra presente en el suelo por que forma complejos con la materia orgánica y con los óxidos de hierro y manganeso. Sin embargo la disponibilidad para la finca tres se presenta en valores menores a 0.87 mg/kg (Ver figura 13).

**Tabla 15. Concentraciones de plomo disponible (mg/kg) en las diferentes fincas de acuerdo con el punto de muestreo y la profundidad del suelo.**

PROFUNDIDAD DEL SUELO	PUNTO DE MUESTREO	FINCAS DE SAN VICENTE DE CHUCURÍ PLOMO DISPONIBLE (mg/Kg)		
		FINCA UNO	FINCA DOS	FINCA TRES
(0-20 cm)	1	0.400	ND	1.753
	2	1.280	ND	0.326
	3	1.880	ND	0.221
	4	0.340	ND	0.533
	5	0.350	ND	NC
(20-40cm)	1 A	0.300	ND	1.519
	2 A	0.110	ND	ND
	3 A	0.480	ND	ND
	4 A	ND	ND	0.277
	5 A	0.290	ND	NC

Las concentraciones de plomo disponible en las fincas analizadas en su capa superior e inferior son muy variables dependiendo del punto de muestreo, para la finca uno el punto de muestreo tres presenta el mayor valor de 1.88 y 0.480mg/Kg, en la finca tres el punto de muestreo uno tiene valores correspondientes de 1.75 y 1.52 mg/Kg lo demuestran (ver Tabla 15).

**Tabla 16. Porcentaje de disponibilidad de plomo en suelos de muestreo**

Profundidad del Suelo	Punto de Muestreo	Porcentaje de disponibilidad Plomo (%)	
		FINCA UNO	FINCA TRES
0-20cm	1	3.17	38.8
	2	9.04	4.32
	3	21.6	2.75
	4	5.44	7.39
	5	9.10	NC
<b>PROMEDIO</b>		9.67	13.31
20-40cm	1 A	55.5	51.8
	2 A	53.6	ND
	3 A	46.0	ND
	4 A	ND	4.58
	5 A	19.0	NC
<b>PROMEDIO</b>		45.5	28.2

En la tabla 16 se presenta el porcentaje de disponibilidad de plomo cuantificado en las muestras de suelo. Observando la tabla notamos que el porcentaje de plomo es mayor en la capa inferior de las fincas con valores promedio de 45.5% y 28.2%, respectivamente. Sin embargo, la concentración de plomo disponible para esta misma capa (A) no supera valores de 1.6 mg/kg (Ver tabla 15).

De acuerdo con reportes de literatura los niveles mínimos permitidos de plomo para suelos agrícolas están en un rango de 20-50 mg/kg [56]. A partir de los datos analizados, podemos afirmar que el suelo de la región de San Vicente de Chucurí no está contaminado, porque las concentraciones halladas están por debajo de los límites mínimos permisibles.

## CONCLUSIONES

La validación interna permitió cuantificar y evaluar experimentalmente las figuras de mérito como el límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud requeridas en la cuantificación de cadmio y plomo.

El método analítico empleado para determinación de plomo en cacao por FAAS no es sensible porque se requiere un límite de detección inferior al obtenido en las muestras.

Las técnicas analíticas permiten determinar la presencia de cadmio en los granos de cacao de la región cacaotera de San Vicente de Chucurí que hasta el momento era un supuesto; permitiendo su aplicación para las demás zonas cacaoteras del país.

En este estudio se verificó que las fincas analizadas poseen granos de cacao contaminados con cadmio en un rango de 4 - 7 mg/kg, que superan los niveles de cadmio establecidos para alimentos por la Organización Mundial de la Salud de 0.1 mg/kg de cadmio.

Las tendencias observadas demuestran que el cadmio está distribuido uniformemente en el suelo, cuando su concentración es elevada. Se encontró un rango de concentración de cadmio de 0.33 a 6.00 mg/kg en los suelos analizados, probablemente su presencia se debe a los procesos de formación de suelos de la región (Formación Umir).

En los suelos agrícolas de la región de San Vicente de Chucurí que fueron analizados se encontró que el contenido de plomo oscilaba en un rango de 0.15

a 14.15 mg/kg de este elemento. Estas concentraciones no superan los valores establecidos para suelos que se consideran contaminados donde su valor establecido es mayor a 50 mg/kg de plomo.

## **RECOMENDACIONES**

Realizar muestreos en zonas aledaños que contengan cultivos jóvenes de cacao para determinarle cadmio y plomo tanto al suelo como a los frutos con el fin de correlacionar posibles influencias para el contenido de estos metales.

Realizar a las muestras de suelos y materiales empleados en la fortificación del suelo todos los parámetros fisicoquímicos que permitan un mejor conocimiento y relación con la disponibilidad de estos metales.

Comparar las normas EPA 3050, NTC 3888 y NTC 3934 para la determinación de cadmio total en suelos, si existe diferencia significativa entre las dos metodologías.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mounicou, S.; Szpunar, J.; Ryszard. Bioavailability of cadmium and lead in cocoa: comparison of extraction procedures prior to size-exclusion fast-flow liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP-MS). *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, 17, 880–886.
2. Berg, T.; Licht, D. International legislation on trace elements as contaminants in food: a review. *Food. Addit. Contam.* **2002**, 19(10), 916-927.
3. Gómez, A.; Azóca, A. Áreas potenciales para el desarrollo del cultivo cacao en el estado de Mérida. *Agronomía Trop.* **2002**, 52(4), 403-425.
4. Chávez, A.; Mansilla, J. Programa para el desarrollo de la Amazonía. Ministerio de agricultura. Perú. **2004**. p 9-12.
5. Prieto, J.; Gonzales, C.; Gutiérrez, R. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical. Subtrop. Agroecosystems.* **2009**, 10, 29 – 44.
6. Kabata, A.; Pendias. Soil–plant transfer of trace elements an environmental issue. *Geoderma.* **2004**, 122, 143–149.
7. Sahuquillo, A.; Rigol, G. Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trends. Analyt. Chem.* **2003**, 3(22), 152-159.
8. Ekpa, O.; Akpan, A. Industrially important parameters and mineral composition of cocoa: A comparative study cocoa of cocoa pod husks and beans from plantations in southern Nigeria. *J. Sci. Food. Agric.* **1993**, 61, 47-50.

9. Abollino, O.; Aceto, M.; Malandrino, M. Heavy metals in agricultural soils from Piedmont, Italy. Distribution, speciation and chemometric data treatment. *Chemos.***2002**, 49, 545–557.
10. Micó, C.; Peris, M.; Sánchez, J.; Recatalá, L. Heavy metal content of agricultural soils in a mediterranean semiarid area: the segura river valley (Alicante, Spain). *Spanish J. Agric. Research.* **2006**, 4(4), 363-372.
11. Carrasquero, A.; Adam, M. Determinación de los procesos asociados a la contaminación con cadmio en cacao en ocumare de la costa, estado Aragua. / *Congreso Venezolano del Cacao y su Industria.* **1997**, 220-231.
12. Charley, W.; Jerome, O.; Jupdeed, K. Lead contamination in cocoa and cocoa products: isotopic evidence of global contamination. *Environ. Health Perspect.***2005**, 113(10), 1344-1348.
13. Charley, W.; Russell, F. Lead in cocoa and chocolate: Rankin and Flegal respond. *Environ. Health Perspect.* **2006**, 114(5), A 275.
14. Mounicou, S.; Szpunar, J. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additive. Contaminants.* **2003**, 20(4), 343 -356.
15. Sudhir, D.; Rupali, K.; Hegde, R. Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. *J. Food Comp. Analysis.* **2005**, 18, 517–52
16. Duran, A.; Tuzen, M.; Soylak, M. Trace metal contents in chewing gums and candies marketed in turkey. *Environ. Monit. Assess.* **2009**, 149, 283–289.

17. Pocięcha, M.; Lestan, D. EDTA leaching of Cu contaminated soil using electrochemical treatment of the washing solution. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 165 (1-3), 533-539
18. Capar, S.; Mindark, W.; Cheng, J. Analysis of food for toxic elements. *Anal. Bioanal Chem.* **2007**, 389, 159–169.
19. Cabrera, C.; Lorenzo, M.; Gallego, C. Cadmium contamination levels in seafood determined by electrothermal atomic absorption spectrometry after microwave dissolution. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 126-128.
20. Mehmet, Y.; Durak, M. Comparison of dry, wet, and microwave ashing methods for the determination of Al, Zn, and Fe in yogurt samples by atomic absorption spectrometry. *Spectroscopy Letters.* **2005**, 38, 405–417.
21. Tuzen, M.; Soylak, M. Multi-element coprecipitation for separation and enrichment of heavy metal ions for their flame atomic absorption spectrometric determinations. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 162, 724–729.
22. Marcia, M.; Marco, A.; Arruda, F. On-line separation and preconcentration of cadmium, lead and nickel in a fullerene (C<sub>11</sub>) minicolumn coupled to flow injection tungsten coil atomic absorption spectrometry. *Analyt. Chimic. Acta.* **1998**, 368, 255–263.
23. Tulay, O.; Serife, T.; Vedat, Y. Determination of lead and cadmium in food samples by the coprecipitation method. *Food Chem.* **2009**, 113(4), 1314-1317.
24. Gulda, M.; Dadelen, A. Determination and comparison of some trace elements in different chocolate types produced in Turkey. *J. Food. Agric. Environ.* **2008**, 6 (3), 90 - 94.

25. Onianwa, I.; Detola, C.; Iwegbue, M. Trace heavy metals composition of some Nigerian beverages and food drinks. *Food Chem.* **1999**, 66, 275-279.
26. Gemma, P.; Roser, M.; Domingo, J. Effects of various cooking processes on the concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (23), 11262–11269.
27. Sebahat, T.; Polat, A.; Murat. Interaction between anemia and blood levels of iron, zinc, copper, cadmium and lead in children. *Indian J. Pediatrics.* **2007**, 74, 827-830.
28. Crowe, A.; Morgan, E. Effect of dietary cadmium on iron metabolism in growing rats. *Toxicology. Applied Pharma.* **1997**, 145, 136–146.
29. Shuman, K.; Elsenhans, B. The impact of food contaminants on the bioavailability of trace metals. *Trace Elem. Med. Bio.* **2002**, 16, 139-144.
30. Cruces, E.; Marint, F. Cadmium binding capacity of cocoa and isolated total dietary fiber under physiological pH conditions. *J. Sci. Food. Agric.* **1996**, 72, 476-482.
31. Valente, C. Estudio de la composición de la fibra alimentaria de cacao crudo y procesado. *Food. Techn.* **1995**, 378, 127-132.
32. Mounicou, S.; Szpunar, J. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additive. Contaminants.* **2003**, 20(4), 343 -356.
33. Shuman, K.; Elsenhans, B. The impact of food contaminants on the bioavailability of trace metals. *Trace Elem. Med. Bio.* **2002**, 16, 139-144.

34. Soisungwan, S.; Haswel, E.; Moore, M. Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *British J. Nutrit.* **2000**, 84, 791- 802.
35. Mann, S.; RATE, A.; Gilkes, R. Cadmium Accumulation In Agricultural Soils In Western Australia. *Water, Air, Soil Pollut.* **2002**, 141, 281–297.
36. Mounicou, S.; Szpunar, J.; Andrey, D. Development of a sequential enzymolysis approach for the evaluation of the bioaccessibility of Cd and Pb from cocoa. *The Royal Society. Chem. Analyst*, **2002**, 127, 1638–1641.
37. Jaimes, M. Estandarización y Validación de Algunos Parámetros Físico–Químicos en Suelos para uso Agrícola. Universidad Industrial de Santander. **2005**, 19-32.
38. Ortiz, J.; Peñaranda, S.; Palma, R.; Pardo, D.; Puentes, W. Quinto Curso-Taller Validación de Métodos Analíticos. Programa Vigilancia de la Calidad del Agua Potable, Metales y no Metales de Interés de Salud Pública. **2007**, 9-39.
39. Miller, J.; Miller, C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Ed. 4<sup>a</sup> Prentice Hall. **2002**, 77-106.
40. Cline, M. Principles of soil sampling. *Soil Sci.* **2002**, 58, 275–288.
41. Gutiérrez, F.; Osorio, W. Evaluación de la calidad del dato analítico. Diagnostico Químico de la Fertilidad de Suelos. Comité Departamental de Cafeteros de Antioquia. **2007**, 8.
42. Carter, M.R.; Gregorich, E.G. Soil sampling and methods of analysis. Second Edition. Chapter 10. 2008.

43. AOAC Official method 13.001. Moisture in Cacao Products. Preparation of sample. J. AOAC **1998**, 13, 236.
44. AOAC Official method 13.005. Ash of Cacao Products. J. AOAC **1998**, 13, 236.
45. AOAC Official method 999.11. Lead, Cadmium, Copper, Iron And Zinc In Foods. J. AOAC **2000**, 83, 1204.
46. Edgell, K.; USEPA Method 3050B. Acid digestion sediments, sludges, and soils. **1996**.
47. SEMANART. Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Norma Oficial Mexicana 021. **2002**.
48. Bermúdez, L.; Gonzales, L. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Trop.* **2009**, 59(2), 119-127.
49. Ross, S. M.; Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. En: Toxic metals in soil-plant systems. *John Wiley & Sons*, **1994**, pp. 3-25.,
50. Gonzales, A. Determinación y validación de cadmio total e intercambiable en algunos suelos cacaoteros del departamento de Santander. Tesis de grado (Química) UIS. Escuela de Química. **2009**, 8-10.
51. Angelova, V.; Ivanova, R.; Delibaltova, V.; Ivanov, K. Bioaccumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products.* **2004**, 19, 197-205.

52. [http://www.ingeominas.gov.co/index2.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=1301&Itemid=1](http://www.ingeominas.gov.co/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=1301&Itemid=1)]
53. Piersynsl, G.; Sims, J. Soil an Enviromental quality. Second Edition. CRC Pres Boca Raton. New York. **2000**, 459.
54. Cook, M.; Morrow, H. Anthropogenic Sources of Cadmium in Canada," National Workshop on Cadmium Transport Into Plants. *Canadian Network of Toxicology Centres*. **1995**, 20-21.
55. Basta, N. Heavy metal and trace element chemistry in residual-treated soil: Implications on metal bioavailability and sustainable land application. *Sustainable land application Conference*. **2004**.
56. McLaughlin, M.J.; Parker, D.R.; Clarke, J.M.. Metals and micronutrients-food safety issues. *Field Crops Research*. **1999**, **60**, 143-163.

# **ANEXOS**

**Anexo A. Valores de la Distribución de Student para un 95 % de Confianza**

<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>PROBABILIDAD DEL 95%</b>
1	12,71
2	4,30
3	3,18
4	2,78
5	2,57
6	2,45
7	2,36
8	2,31
9	2,26
10	2,23
11	2,20
12	2,18
13	2,16
14	2,14
15	2,13
16	2,12
17	2,11
18	2,10
19	2,09
20	2,08
21	2,08
22	2,07
23	2,07
24	2,06
25	2,06
26	2,06
27	2,05
28	2,05
29	2,05
30	2,04
50	2,01
$\alpha$	1.96

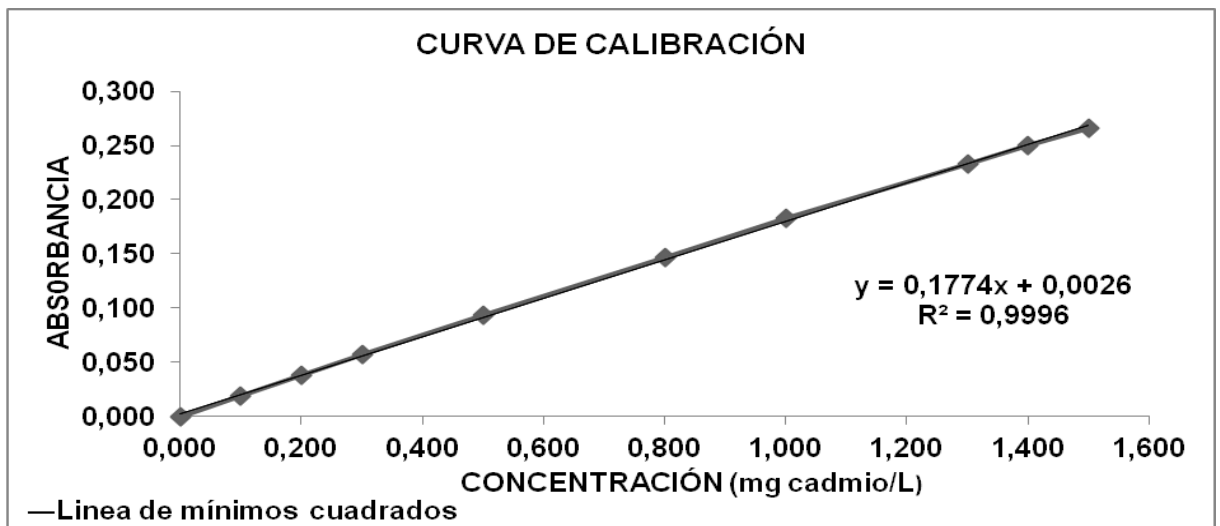
## Anexo B. Método para la Determinación de Cadmio en Cacao Fresco

Tabla 1. Lecturas de absorbancia realizadas a los patrones de curva de calibración.

Patrón	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio	Desvest
0	0.000	0.001	0.000	0.000	-0.001	0.001	0.000	0.001
0.1	0.020	0.026	0.015	0.028	0.011	0.015	0.019	0.007
0.2	0.040	0.051	0.030	0.056	0.022	0.028	0.038	0.014
0.3	0.061	0.075	0.046	0.083	0.035	0.041	0.057	0.019
0.5	0.098	0.124	0.075	0.135	0.058	0.070	0.093	0.031
0.8	0.155	0.195	0.118	0.214	0.091	0.110	0.147	0.049
1.0	0.193	0.241	0.146	0.264	0.115	0.136	0.183	0.060
1.3	0.246	0.305	0.188	0.335	0.148	0.177	0.233	0.075
1.4	0.266	0.330	0.202	0.357	0.158	0.187	0.250	0.081
1.5	0.283	0.348	0.211	0.380	0.169	0.202	0.266	0.085
R	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.001
M	0.188	0.233	0.269	0.102	0.112	0.133	0.177	0.068
B	0.002	0.004	0.004	0.005	0.004	0.001	0.003	0.002

Con el promedio de los valores de absorbancia para cada patrón se construyó la curva de calibración de cadmio total mostrada en la figura 1.

Figura 1. Curva de calibración de cadmio total en cacao fresco.



**Tabla 2. Concentración encontrada en las diversas soluciones de trabajo durante 6 días.**

Día	Concentración en mg/L				Concentración en mg/Kg			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub>
Día1	0,065	0,066	0,124	1,347	3.026	9.149	5.148	12.317
Día 2	0,074	0,072	0,126	1,331	3.179	9.200	5.056	12.256
Día 3	0.074	0,071	0,131	1,339	3.169	9.333	5.025	12.113
Día 4	0,064	0,064	0.135	1,379	2.984	9.118	5.138	12.133
Día 5	0,073	0,072	0,123	1,320	3.098	9.313	5.179	12.205
Día 6	0,071	0,073	0,129	1,348	3.056	9.128	5.036	12.389
Media	0.070		0.128	1.344	3.085	9.207	5.100	12.236
<b>Desvest</b>	0.004		0.005	0.020	0.078	0.095	0.070	<b>0.110</b>
<b>%CV</b>	<b>6.093</b>		<b>3.563</b>	<b>1.496</b>	<b>2.534</b>	<b>1.027</b>	<b>1.292</b>	<b>0.873</b>

**Tabla 3. Cálculo del porcentaje de recuperación a rango bajo.**

Día	Masa de muestra $1 \times 10^{-3}$	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub> (mg/kg)	$((M_1+A_1)-3.085) \times \text{Masa}$ (mg)	%Rec.A <sub>1</sub> .
Día 1	9.750	5.148	0.020	100.00
Día 2	9.750	5.056	0.019	95.00
Día 3	9.750	5.025	0.019	95.00
Día 4	9.750	5.138	0.020	100.00
Día 5	9.750	5.179	0.020	100.00
Día 6	9.750	5.036	0.019	95.00
<b>Promedio</b>	9.750	5.146	0.019	97.50

**Tabla 4. Cálculo del porcentaje de recuperación de rango alto.**

Día	Masa de muestra $1 \times 10^{-3}$ (kg)	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub> (mg/kg)	$((M_2+A_2)-9.207) \times \text{Masa}$ (mg)	%Rec.A <sub>2</sub> .
Día 1	9.750	12.317	0.030	100.00
Día 2	9.750	12.256	0.030	100.00
Día 3	9.750	12.113	0.028	93.30
Día 4	9.750	12.133	0.029	96.70
Día 5	9.750	12.205	0.029	96.70
Día 6	9.750	12.389	0.031	103.30
<b>Promedio</b>	9.750	12.240	0.030	98.30

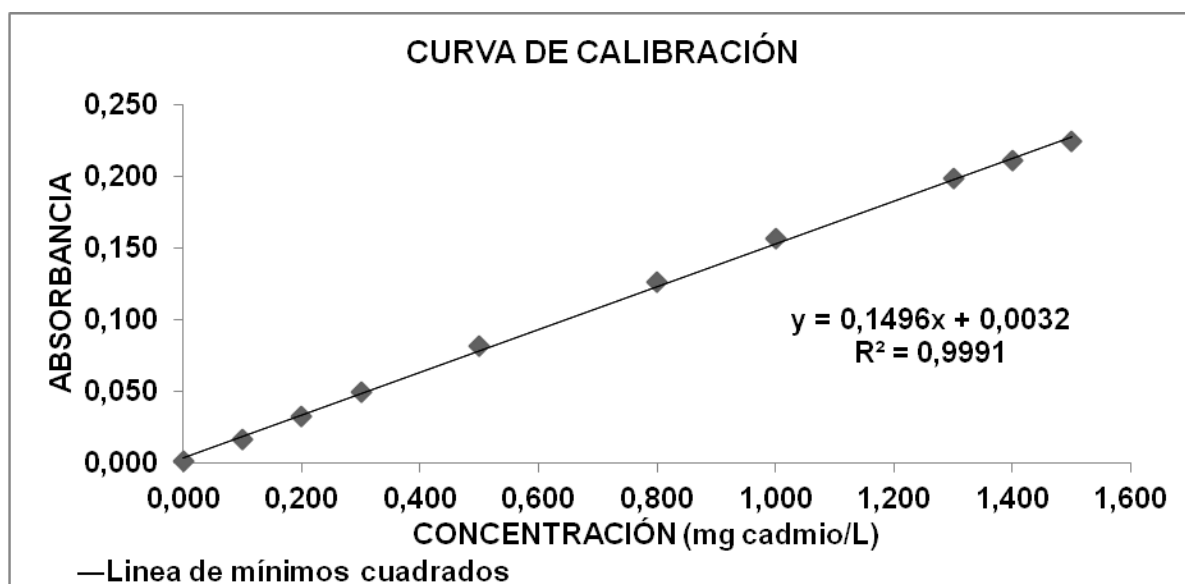
## Anexo C. Método para la Determinación de Cadmio Total en Suelo

Tabla 1. Lecturas de absorbancia realizadas a los patrones de curva de calibración.

Patrón	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio	Desvest
<b>0</b>	0.000	0.001	0.000	0.000	-0.001	0.001	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
<b>0.1</b>	0.018	0.031	0.015	0.010	0.011	0.015	<b>0.016</b>	<b>0.008</b>
<b>0.2</b>	0.039	0.058	0.030	0.020	0.022	0.028	<b>0.032</b>	<b>0.014</b>
<b>0.3</b>	0.058	0.087	0.046	0.030	0.035	0.041	<b>0.049</b>	<b>0.021</b>
<b>0.5</b>	0.095	0.142	0.075	0.051	0.058	0.070	<b>0.081</b>	<b>0.033</b>
<b>0.8</b>	0.141	0.217	0.118	0.082	0.091	0.110	<b>0.126</b>	<b>0.049</b>
<b>1.0</b>	0.173	0.268	0.146	0.103	0.115	0.136	<b>0.156</b>	<b>0.060</b>
<b>1.3</b>	0.210	0.334	0.188	0.133	0.148	0.177	<b>0.198</b>	<b>0.072</b>
<b>1.4</b>	0.220	0.359	0.202	0.143	0.158	0.187	<b>0.211</b>	<b>0.078</b>
<b>1.5</b>	0.232	0.380	0.211	0.153	0.169	0.202	<b>0.224</b>	<b>0.081</b>
<b>R</b>	0.997	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	<b>0.999</b>	<b>0.001</b>
<b>M</b>	0.155	0.251	0.269	0.102	0.112	0.133	<b>0.170</b>	<b>0.072</b>
<b>B</b>	<b>0.008</b>	<b>0.008</b>	<b>0.004</b>	<b>0.003</b>	<b>0.004</b>	<b>0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>0.003</b>

Con el promedio de los valores de absorbancia para cada patrón se construyó la curva de calibración de cadmio total como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Curva de Calibración de Cadmio Total en Suelos.



**Tabla 2. Concentración encontrada en las diversas soluciones de trabajo durante 6 días.**

Día	Concentración en mg/L				Concentración en mg/Kg			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub>
<b>Día 1</b>	0,069	0,058	0,136	1,330	6.54	19.70	10.04	<b>24.16</b>
<b>Día 2</b>	0,071	0,07	0,121	1,346	6.16	19.96	10.10	<b>23.84</b>
<b>Día 3</b>	0,065	0,063	0,124	1,360	6.38	19.94	10.06	<b>23.86</b>
<b>Día 4</b>	0,065	0,069	0,126	1,352	6.14	20.24	10.12	<b>23.88</b>
<b>Día 5</b>	0,069	0,062	0,127	1,344	5.98	20.30	10.14	<b>23.82</b>
<b>Día 6</b>	0,064	0,067	0,125	1,345	6.16	19.80	10.08	<b>23.96</b>
<b>Media</b>	0.066		0.126	1.312	6.22	19.99	10.09	<b>23.92</b>
<b>Desvest</b>	0.004		0.004	0.008	0.216	0.237	0.037	<b>0.011</b>
<b>%CV</b>	<b>5.850</b>		<b>3.170</b>	<b>0.609</b>	<b>3.48</b>	<b>1.180</b>	<b>0.370</b>	<b>0.497</b>

**Tabla 3. Cálculo del porcentaje de recuperación a rango bajo.**

Día	Masa de muestra 1x10 <sup>-3</sup> (kg)	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub> (mg/kg)	$((M_1+A_1)-6.22) \times \text{Masa}$ 1x10 <sup>-3</sup> (mg)	%Rec.A <sub>1</sub> .
Día 1	2.50	10.04	9.55	95.50
Día 2	2.50	10.10	9.70	97.00
Día 3	2.50	10.06	9.60	96.00
Día 4	2.50	10.12	9.75	97.50
Día 5	2.50	10.14	9.80	98.00
Día 6	2.50	10.08	9.65	96.50
<b>Promedio</b>	2.50	10.09	9.67	96.70

**Tabla 4. Cálculo del porcentaje de recuperación de rango alto.**

Día	Masa de muestra 1x10 <sup>-3</sup> (kg)	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub> (mg/kg)	$((M_2+A_2)-19.99) \times \text{Masa}$ 1x10 <sup>-3</sup> (mg)	%Rec.A <sub>2</sub> .
Día 1	2.50	24.16	10.42	104.20
Día 2	2.50	23.84	9.625	96.25
Día 3	2.50	23.86	9.675	96.75
Día 4	2.50	23.88	9.725	97.25
Día 5	2.50	23.82	9.575	95.75
Día 6	2.50	23.96	9.925	99.25
<b>Promedio</b>	2.50	23.92	9.670	98.24

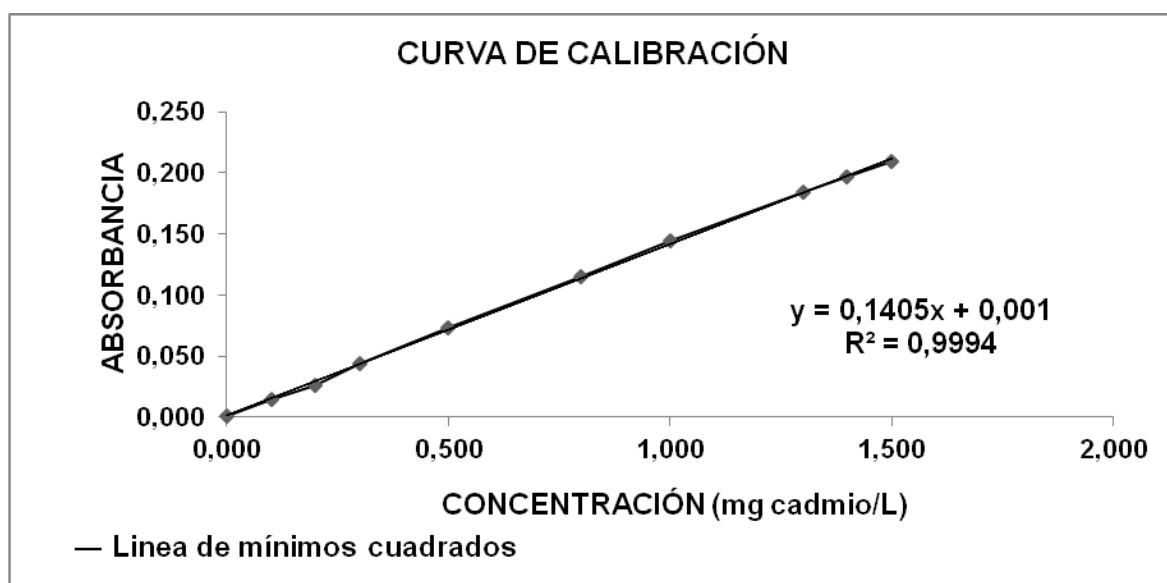
## Anexo D. Método para la Determinación de Cadmio Disponible en Suelo

Tabla 1. Lecturas de absorbancia realizadas a los patrones de curva de calibración.

Patrón [mg/L]	Día 1	Día 2	Día 3	Día4	Día 5	Día 6	Promedio	Desvest
<b>0.000</b>	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
<b>0.100</b>	0.014	0.013	0.012	0.016	0.012	0.020	<b>0.014</b>	<b>0.003</b>
<b>0.200</b>	0.029	0.026	0.025	0.031	0.025	0.039	<b>0.026</b>	<b>0.005</b>
<b>0.300</b>	0.041	0.040	0.039	0.047	0.039	0.060	<b>0.044</b>	<b>0.008</b>
<b>0.500</b>	0.068	0.066	0.065	0.077	0.065	0.099	<b>0.073</b>	<b>0.013</b>
<b>0.800</b>	0.105	0.104	0.104	0.120	0.104	0.153	<b>0.115</b>	<b>0.020</b>
<b>1.000</b>	0.131	0.131	0.131	0.151	0.131	0.192	<b>0.144</b>	<b>0.025</b>
<b>1.300</b>	0.168	0.168	0.167	0.193	0.167	0.242	<b>0.184</b>	<b>0.030</b>
<b>1.400</b>	0.181	0.179	0.182	0.206	0.182	0.256	<b>0.197</b>	<b>0.030</b>
<b>1.500</b>	0.193	0.189	0.191	0.217	0.191	0.278	<b>0.209</b>	<b>0.035</b>
<b>R</b>	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	<b>0.999</b>	<b>0.000</b>
<b>M</b>	0.127	0.127	0.129	0.145	0.129	0.184	<b>0.140</b>	<b>0.023</b>
<b>B</b>	<b>0.002</b>	<b>0.007</b>	<b>0.006</b>	<b>0.002</b>	<b>0.006</b>	<b>0.003</b>	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>

Con el promedio de los valores de absorbancia para cada patrón se construyó la curva de calibración de cadmio disponible como se muestra en la figura 1.

Figura1. Curva de calibración de cadmio disponible en suelos.



**Tabla 2. Concentración encontrada en las diversas soluciones de trabajo durante 6 días.**

Día	Concentración en mg/L				Concentración en mg/Kg			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub>
Día 1	0.108	0.119	0.136	1.330	0.320	1.412	1.316	<b>2.390</b>
Día 2	0.111	0.117	0.130	1.345	0.332	1.408	1.306	<b>2.370</b>
Día 3	0.122	0.111	0.124	1.360	0,344	1.409	1.330	<b>2.330</b>
Día 4	0.114	0.121	0.125	1.350	0.340	1.402	1.306	<b>2.350</b>
Día 5	0.105	0.116	0.127	1.344	0.328	1.411	1.320	<b>2.380</b>
Día 6	0.118	0.115	0.125	1.346	0.352	1.405	1.330	<b>2.340</b>
<b>Media</b>	0.115		0.127	1.346	0.336	1.407	1.318	<b>2.360</b>
<b>Desvest</b>	0.002		0.005	0.007	0.011	0.034	0.010	<b>0.026</b>
<b>%CV</b>	<b>4.420</b>		<b>3.937</b>	<b>0.520</b>	<b>3.450</b>	<b>2.416</b>	<b>0.819</b>	<b>1.180</b>

**Tabla 3. Cálculo del porcentaje de recuperación a rango bajo.**

Día	Masa de muestra 1x10 <sup>-3</sup> (kg)	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub> (mg/kg)	$((M_1+A_1-0.336) \times \text{Masa})$ 1x10 <sup>-3</sup> (mg)	%Rec.A <sub>1</sub>
Día 1	10.00	1.316	9.80	98.0
Día 2	10.00	1.306	9.70	97.0
Día 3	10.00	1.330	9.94	99.4
Día 4	10.00	1.306	9.70	97.0
Día 5	10.00	1.320	9.84	98.4
Día 6	10.00	1.330	9.94	99.4
<b>Promed</b>	10.00	1.318	9.82	98.2

**Tabla 4. Cálculo del porcentaje de recuperación de rango alto.**

Día	Masa de muestra 1x10 <sup>-3</sup> (kg)	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub> (mg/kg)	$((M_2+A_2)-1.407) \times \text{Masa}$ 1x10 <sup>-3</sup> (mg)	%Rec.A <sub>2</sub>
Día 1	10.00	2.390	9.830	98.30
Día 2	10.00	2.370	9.630	96.30
Día 3	10.00	2.330	9.230	92.30
Día 4	10.00	2.350	9.430	94.30
Día 5	10.00	2.380	9.730	97.30
Día 6	10.00	2.340	9.330	93.30
<b>Promedio</b>	10.00	2.360	9.530	95.30

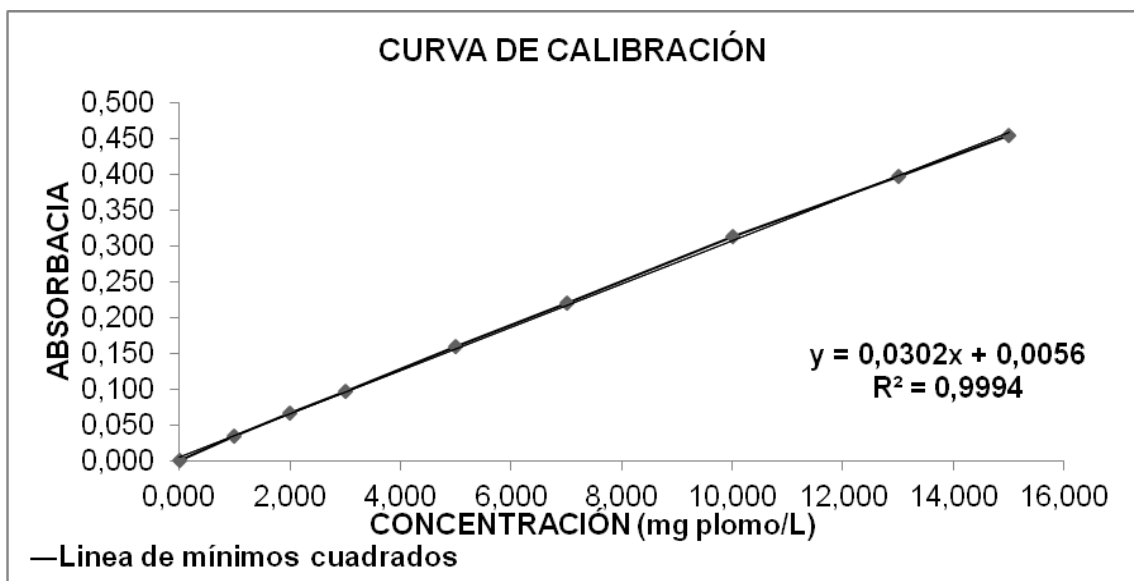
## Anexo E. DETERMINACIÓN DE PLOMO TOTAL EN SUELO

Tabla 1. Lecturas de absorbancia realizadas a los patrones de curva de calibración.

Patrón [mg/L]	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio	Desvest
0	-0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>
1	0.029	0.032	0.032	0.033	0.040	0.040	<b>0.034</b>	<b>0.005</b>
2	0.056	0.062	0.060	0.063	0.083	0.078	<b>0.067</b>	<b>0.011</b>
3	0.085	0.085	0.089	0.088	0.122	0.118	<b>0.097</b>	<b>0.017</b>
5	0.139	0.144	0.146	0.144	0.199	0.189	<b>0.160</b>	<b>0.026</b>
7	0.189	0.197	0.190	0.199	0.275	0.267	<b>0.220</b>	<b>0.040</b>
10	0.272	0.281	0.283	0.280	0.377	0.387	<b>0.313</b>	<b>0.053</b>
13	0.351	0.357	0.362	0.354	0.482	0.470	<b>0.396</b>	<b>0.062</b>
15	0.401	0.400	0.412	0.401	0.546	0.563	<b>0.453</b>	<b>0.078</b>
R	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	0.998	<b>0.999</b>	<b>0.001</b>
M	0.026	0.026	0.027	0.026	0.036	0.037	<b>0.030</b>	<b>0.005</b>
B	<b>0.004</b>	<b>0.006</b>	<b>0.006</b>	<b>0.007</b>	<b>0.009</b>	<b>0.002</b>	<b>0.005</b>	<b>0.002</b>

Con el promedio de los valores de absorbancia para cada patrón se construyó la curva de calibración de plomo total en suelo mostrada en la figura 1.

Figura 1. Curva de calibración de plomo total en suelo



**Tabla 2. Concentración encontrada en las diversas soluciones de trabajo durante 6 días.**

DíaC	Concentración en mg/L				Concentración en mg/Kg			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub>
Día 1	0.067	0.075	1.340	14.25	77.42	214.4	117.3	246.1
Día 2	0.058	0.070	1.292	13.94	78.90	210.7	117.1	246.3
Día 3	0.069	0.067	1.315	13.79	77.66	205.6	117.4	248.2
Día 4	0.064	0.073	1.321	13.86	75.96	205.9	117.8	244.8
Día 5	0.063	0.071	1.333	13.70	77.32	205.3	116.9	246.5
Día 6	0.072	0.059	1.278	13.62	79.30	204.9	115.2	247.7
<b>Media</b>	0.067		1.313	13.86	77.46	207.8	117.0	246.6
<b>Desv</b>	0.005		0.033	0.415	1.446	3.875	2.418	1.230
<b>%CV</b>	7.462		2.513	3.000	1.866	1.864	2.046	0.500

**Tabla 3. Cálculo del porcentaje de recuperación a rango bajo.**

Día	Masa de muestra $1 \times 10^{-3}$ (kg)	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub> (mg/kg)	$((M_1+A_1)-77.46) \times \text{Masa}$ (mg)	%Rec.A <sub>1</sub> .
Día 1	2.50	117.3	0.106	99.60
Día 2	2.50	117.1	0.099	99.00
Día 3	2.50	117.4	0.099	99.00
Día 4	2.50	117.8	0.100	100.00
Día 5	2.50	116.9	0.098	98.60
Día 6	2.50	115.2	0.094	94.00
<b>Promedio</b>	2.50	117.0	0.099	98.36

**Tabla 4. Cálculo del porcentaje de recuperación de rango alto.**

Día	Masa de muestra $1 \times 10^{-3}$ (kg)	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub> (mg/kg)	$((M_2+A_2)-207.8) \times \text{Masa}$ (mg)	%Rec.A <sub>2</sub> .
Día 1	2.50	246.1	0.095	95.00
Día 2	2.50	246.3	0.096	96.00
Día 3	2.50	248.2	0.101	101.0
Día 4	2.50	244.8	0.092	92.00
Día 5	2.50	246.5	0.096	96.00
Día 6	2.50	247.7	0.099	99.00
<b>Promedio</b>	2.50	246.6	0.097	96.50

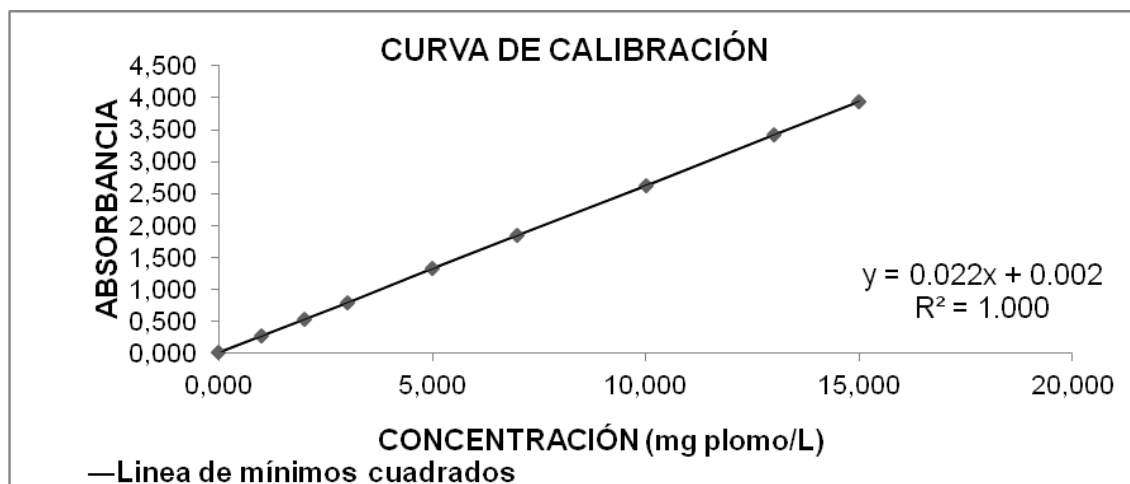
## Anexo F. DETERMINACIÓN DE PLOMO DISPONIBLE EN SUELO

Tabla 1. Lecturas de absorbancia realizadas a los patrones de curva de calibración.

Patrón [mg/L]	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio	Desvest
0	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>
1	0.020	0.021	0.026	0.028	0.027	0.029	<b>0.025</b>	<b>0.004</b>
2	0.040	0.043	0.053	0.052	0.055	0.058	<b>0.050</b>	<b>0.007</b>
3	0.060	0.064	0.080	0.078	0.077	0.081	<b>0.073</b>	<b>0.009</b>
5	0.101	0.107	0.131	0.129	0.126	0.134	<b>0.121</b>	<b>0.014</b>
7	0.138	0.143	0.182	0.179	0.175	0.183	<b>0.167</b>	<b>0.021</b>
10	0.199	0.202	0.252	0.250	0.243	0.253	<b>0.233</b>	<b>0.026</b>
13	0.253	0.266	0.327	0.322	0.332	0.326	<b>0.304</b>	<b>0.035</b>
15	0.401	0.375	0.389	0.360	0.371	0.373	<b>0.378</b>	<b>0.015</b>
R	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	0.998	<b>0.999</b>	<b>0.001</b>
M	0.019	0.019	0.024	0.024	0.024	0.024	<b>0.022</b>	<b>0.003</b>
B	0.006	0.005	0.005	0.003	0.003	0.006	<b>0.005</b>	<b>0.001</b>

Con el promedio de los valores de absorbancia para cada patrón se construyó la curva de calibración de plomo disponible en suelo mostrada en la figura 1.

Figura 1. Curva de calibración de plomo disponible en suelo.



**Tabla 2. Concentración encontrada en las diversas soluciones de trabajo durante 6 días.**

Día	Concentración en mg/L				Concentración en mg/Kg			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub>
Día 1	0.055	0.065	1.340	13.290	5.788	15.342	10.972	23.260
Día 2	0.056	0.061	1.370	13.218	5.882	15.172	10.802	23.310
Día 3	0.057	0.059	1.315	13.490	5.830	15.082	10.852	23.116
Día 4	0.055	0.062	1.327	13.420	5.624	14.958	10.246	23.100
Día 5	0.056	0.063	1.348	13.215	5.782	14.946	10.462	23.080
Día 6	0.060	0.059	1.330	12.880	5.660	15.172	10.526	23.120
Media		0.059	1.338	13.252	5.761	15.112	10.644	23.173
Desve		0.004	0.019	0.213	0.100	0.150	0.277	0.093
%CV		6.308	1.434	1.609	1.728	0.992	2.600	0.401

**Tabla 3. Cálculo del porcentaje de recuperación a rango bajo.**

Día	Masa de muestra 1x10 <sup>-3</sup> (kg)	M <sub>1</sub> +A <sub>1</sub> (mg/kg)	$((M_1+A_1)-5.761) \times \text{Masa}$ 1x10 <sup>-2</sup> (mg)	%Rec.A <sub>1</sub> .
Día 1	10.00	10.972	5.20	104.20
Día 2	10.00	10.802	5.04	100.80
Día 3	10.00	10.856	5.09	101.90
Día 4	10.00	10.246	4.49	89.70
Día 5	10.00	10.462	4.70	94.00
Día 6	10.00	10.526	4.77	95.30
Promedio	10.00	10.644	4.88	97.65

**Tabla 4. Cálculo del porcentaje de recuperación de rango alto.**

Día	Masa de muestra 1x10 <sup>-3</sup> (kg)	M <sub>2</sub> +A <sub>2</sub> (mg/kg)	$((M_2+A_2)-15.112) \times \text{Masa}$ 1x10 <sup>-2</sup> (mg)	%Rec.A <sub>2</sub> .
Día 1	10.00	23.260	8.15	101.90
Día 2	10.00	23.310	8.20	102.50
Día 3	10.00	23.166	8.05	100.70
Día 4	10.00	23.100	7.99	99.80
Día 5	10.00	23.080	7.97	99.60
Día 6	10.00	23.120	8.01	100.10
Promedio	10.00	23.172	8.06	100.70

