

BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL

Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias · Universidad del Cauca

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LÍNEA

El Comité Editorial de Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial informa que este manuscrito ha cumplido los requisitos editoriales y científicos y ha sido aprobado para publicación, con base en los conceptos emitidos por los pares evaluadores. Se publica anticipadamente, en versión pdf, de manera provisional, con base en la última versión electrónica del manuscrito y sin haber sido sometido a los procesos de edición, diagramación y corrección de estilo.

La versión anticipada de este manuscrito puede ser descargada, usada y citada, aclarando que la versión definitiva que se va a encontrar en la plataforma de la revista, puede diferir de ésta e aspectos de forma.

Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal *in vitro**

Evaluation of cadmium bioaccessibility in chocolate formulations by *in vitro* gastrointestinal digestion

MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN-JAHIR¹; MOLINA-VELASCO, DANIEL-RICARDO²; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER³; SALAZAR-BELEÑO, ANA-MILENA⁴

RESUMEN

Para estudiar la toxicidad del cadmio (Cd) presente en productos de chocolate es necesario conocer su concentración total y determinar la cantidad de Cd que es bioaccesible en el cuerpo humano. Este trabajo se enfocó en evaluar la bioaccesibilidad de Cd en formulaciones de chocolatería con concentraciones de componentes diferentes por digestión gastrointestinales *in vitro*. Esta digestión se realizó a través de un titulador automático con control de temperatura, y control y monitoreo de pH mediante soluciones diluidas ácidas y alcalinas. Se correlacionaron las diferencias de bioaccesibilidad con los componentes principales (cacao, leche, azúcar y contenido de Cd total en el cacao) y, por último, se propuso una formulación de chocolate que tuvo el menor valor de bioaccesibilidad de Cd. Los resultados se expresaron mediante un modelo matemático, con predicciones de 94 % y errores de validación del modelo menores que 9 %. Se obtuvieron valores de bioaccesibilidad de Cd en las formulaciones de chocolate entre 7 y 32 % aproximadamente,

* Proyecto de investigación de origen: "Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal *in vitro*". Financiación: Universidad Industrial de Santander. Culminación: noviembre 2019.

¹ Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). M.Sc. Química. Bucaramanga, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-5139-0163>

² Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear. Doctor en Química. Bucaramanga, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-7897-2526>

³ Universidad Industrial de Santander, Escuela de Ingeniería Química, Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). Doctor en Química, Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bucaramanga, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9267-7016>

⁴ Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Esp. Aseguramiento de la Calidad e Inocuidad Agroalimentaria. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7592-2550>

Correspondencia: cristian.murillo@unipaz.edu.co

Cómo citar este artículo

MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN-JAHIR; MOLINA-VELASCO, DANIEL-RICARDO; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER; SALAZAR-BELEÑO, ANA-MILENA. Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal *in vitro*. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 1, 2022, p. xx-xx. Doi:

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 28 de Octubre 2020

Aprobado para publicación: 27 de Agosto 2021

donde los valores más bajos correspondieron a formulaciones de chocolate amargo (relación másica cacao:azúcar de 7:2). Se concluyó que el contenido de cacao y de azúcar en la formulación disminuyen los valores de bioaccesibilidad de Cd, mientras que el contenido de leche y la concentración de Cd total en el cacao aumentan los valores de bioaccesibilidad.

PALABRAS CLAVE: Cacao; Grasa; Leche; Digestión gástrica; Digestión pancreática; Modelo matemático, Superficie de respuesta; Valor mínimo.

ABSTRACT

To study the toxicity of cadmium (Cd) present in chocolate products, it is necessary to know its total concentration and determine the amount of Cd that is bioaccessible in the human body. This work focused on evaluating the Cd bioaccessibility in chocolate formulations with concentrations of different components by gastrointestinal digestion *in vitro*. This digestion was carried out through an automatic titrator with temperature control, and pH control and monitoring using dilute acid and alkaline solutions. Bioaccessibility differences were correlated with the main components (cocoa, milk, sugar, and total Cd content in cocoa) and, finally, a chocolate formulation was proposed that had the lowest Cd bioaccessibility value. The results were expressed using a mathematical model, with predictions of 94 % and model validation errors less than 9 %. Cd bioaccessibility values in the chocolate formulations were obtained between 7 and 32 %, approximately, where the lowest values corresponded to dark chocolate formulations (cocoa:sugar ratio 7:2). It was concluded that the cocoa and sugar content in the formulation decrease the Cd bioaccessibility values, while the milk content and the total Cd concentration in cocoa increase the bioaccessibility values.

KEYWORDS: Cocoa; Fat; Milk; Gastric digestion; Pancreatic digestion; Mathematical model; Response surface; Minimum value.

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol nativo de las regiones tropicales húmedas de la parte norte de Suramérica y de Centroamérica (Motamayor *et al.*, 2002). Posee numerosos componentes bioactivos como polifenoles, que son potentes antioxidantes para la salud humana; metilxantinas y componentes precursores de aroma, en menor proporción (Perea-Villamil *et al.*, 2009; Pico-Hernández *et al.*, 2019; Villamizar-Jaimes & López-Giraldo, 2017). La producción de cacao es una práctica agrícola que origina productos de exportación importantes para economías en desarrollo de países en África, Asia, Oceanía, Latinoamérica y el Caribe (Jiménez Tobón, 2015), sin embargo, la mayoría del cacao colombiano y, por ende, sus productos derivados como el chocolate, poseen concentraciones elevadas de cadmio.

El cadmio (Cd) es un metal pesado clasificado como contaminante ambiental, proveniente de residuos tanto de fuentes naturales como de prácticas industriales y de agricultura (Hernández-Martínez & Navarro-Blasco, 2012; Satarug *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2018). Como los metales pesados están presentes en productos alimenticios de consumo humano y animal, el contenido de Cd es un criterio indispensable a la hora de evaluar los niveles de toxicidad de los alimentos (Alexander *et al.*, 2009; Zhuravlev *et al.*, 2015; Satarug *et al.*, 2017).

Se ha determinado la presencia de Cd en granos y en productos derivados del cacao; en la mayoría de los casos, la concentración de Cd en los granos de cacao cultivados en diferentes regiones de Latinoamérica supera el límite que estipula la Unión Europea (1,0 mg/kg) (European Food Safety Authority, 2011).

Se han determinado el contenido de Cd en granos de cacao, donde mostraron que tanto en sistemas agroforestales como de monocultivo no hay una diferencia significativa del contenido de Cd (Gramlich *et al.*, 2017). También realizaron la cuantificación del contenido de Cd con valores promedio por encima de 0,9 mg/kg, valor que supera el máximo permitido por las normas europeas (Chavez *et al.*, 2015; Arévalo-Gardini *et al.*, 2017; Gramlich *et al.*, 2018).

En Colombia, no hay una legislación para el control del Cd en el cacao (Jiménez-Tobón, 2015), pese a esto, altos contenidos de Cd podrían limitar la exportación del grano a clientes de la unión europea quienes aprecian los granos de cacao producidos por sus cualidades de fino y de aroma (International Cocoa Organization, 2019). Algunos reportaron concentraciones de Cd de 4,05 mg/kg en chocolates amargos (con 65 % de cacao) comprados en supermercados colombianos, valores muy por encima del límite permitido por la Unión Europea (0,8 mg/kg) (Echeverry & Reyes, 2016). Sin embargo, algunos productos de chocolate pueden tener concentraciones menores de Cd, como chocolate de mesa en polvo y granulado proveniente de Chiquinquirá, Colombia, que se determinó por voltamperometría diferencial de pulso de redisolución anódica, y obtuvieron valores de Cd entre 0,214 y 0,260 mg/kg (Chaparro-Acuña *et al.*, 2017; Lo Dico *et al.*, 2018).

Aunque se ha determinado la cantidad total de Cd en diferentes matrices (Chandra *et al.*, 2014; Zhuang *et al.*, 2016; Bhat *et al.*, 2019), es importante destacar el papel de su bioaccesibilidad. Se define como bioaccesibilidad como la cantidad de sustancia que está disuelta en la parte digestiva y aprovechable para absorción (Peixoto *et al.*, 2016). Algunas investigaciones se han enfocado en el estudio de la bioaccesibilidad de los metales pesados para diversas matrices de alimentos.

Se han estudiado los factores que afectan la bioaccesibilidad del Cd en bebidas achocolatadas; donde encontraron que la bioaccesibilidad del Cd varía según el tipo de muestra, siendo mayor en la formulación light, aproximadamente 11 % (Peixoto *et al.*, 2016; Francisco *et al.*, 2018). También se encontró que, en concentraciones de sales biliares mayores, la bioaccesibilidad del Cd aumenta 3 veces más y, tanto el pH como la presencia de lipasa en la digestión gastrointestinal *in vitro*, no varía significativamente la bioaccesibilidad del Cd (Peixoto *et al.*, 2016). Barraza y colaboradores determinaron la bioaccesibilidad gástrica humana en grano de cacao crudo y en licor de cacao y obtuvieron valores entre el 90 y 100 % de bioaccesibilidad de Cd en las digestiones gástricas *in vitro* para grano y licor de cacao (Barraza *et al.*, 2017).

Algunos autores determinaron la bioaccesibilidad de otros compuestos en productos de cacao, resaltando la selectividad de algunos compuestos en la digestión pancreática (Mounicou *et al.*, 2003), sin embargo, esto no sucede con el Cd, donde puede predominar altos valores de bioaccesibilidad en las fases de digestión, especialmente en la gástrica (Gültekin-Özgüven *et al.*, 2016; Toro-Uribe *et al.*, 2019).

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

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

MÉTODO

Reactivos y muestras

Las muestras de cacao fermentado y seco se obtuvieron del centro de acopio de cacao en el municipio de San Vicente de Chucurí, uno de los mayores productores en el Departamento de Santander. De allí, se seleccionaron de 6 a 10 muestras, con concentraciones de Cd entre 1 y 10 mg/kg y a una altitud entre 550 y 1400 m.s.n.m. También, se utilizaron como ingredientes de la preparación leche en polvo y azúcar refinada de marca comercial, libre de Cd. Los reactivos para el procedimiento de digestión gastrointestinal *in vitro* y la cuantificación de Cd fueron pepsina de mucosa gástrica porcina, pancreatina de páncreas porcino, soluciones estándar de sales biliares, carbonato de amonio y ácido nítrico concentrado; todos marca Merck. Toda el agua que se utilizó en el desarrollo de la investigación fue ultrapura (0,056 $\mu\text{S/cm}$) tipo 1.

Diseño experimental para el efecto de los factores

Las coberturas de chocolate para las digestiones gastrointestinales *in vitro* se fabricaron basado en la Resolución 1511 del INVIMA (Ministerio de la Protección Social, 2011), usando un diseño de experimentos 2^4 más puntos centrales con cuatro factores que describen los componentes principales de la formulación de cacao (Cuadro 1) con un total de 96 experimentos, teniendo el valor de % de bioaccesibilidad de Cd como variable de respuesta. El diseño de experimentos se ejecutó y se analizó mediante el software Statistica.

Cuadro 1. Descripción de los factores y sus niveles para el diseño de experimentos.

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

Preparación de las formulaciones

Para la elaboración del licor de cacao, se realizó el tostado de los granos de cacao fermentados y secos a una temperatura de 120 °C durante 20 min. Luego, se retiró la cascarilla del grano de manera manual y se realizó una premolienda durante 2 min a 4 °C. Por último, se refinó el polvo de cacao resultante hasta obtener el licor. Una vez determinada las cantidades de los ingredientes de las formulaciones por medio de los puntos del diseño experimental, se mezclaron manualmente las proporciones de licor de cacao, leche y azúcar y luego se refinaron hasta obtener una consistencia líquida y uniforme. Se suprimieron los pasos de atemperado y moldeado dado que son pasos que solo afectan a la textura del producto.

Cuantificación de Cd total

Se cuantificó el contenido de Cd total presente en las coberturas de chocolate basado en el procedimiento de Echeverry y Reyes (2016). Se calcinaron aproximadamente 3 g de la muestra en una mufla a 600 °C durante 4 horas. Luego, se disolvió en 10 mL de HCl 6 N y se llevó a ebullición por 5 min. Por último, se filtró el contenido con papel filtro, se adicionaron 3 gotas de HNO₃ al 65 %, y se aforó a 25 mL. Las soluciones resultantes se analizaron por Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) en llama utilizando un equipo PinAAcle 400 Perkin-Elmer y con las siguientes características: gas de combustión aire-

acetileno a una presión de 2,5 Pa y un flujo de 1 L/min. La absorbancia de las muestras se leyó directamente a una longitud de onda de 254 nm.

Digestión gastrointestinal *in vitro*

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

Para la digestión gastrointestinal *in vitro*, se prepararon soluciones estándar electrolíticas que simulaban los fluidos de la digestión gástrica y digestión pancreática. Las soluciones estándar se prepararon con los siguientes reactivos y sus respectivas concentraciones (Cuadro 2). Para ajustar y mantener el pH de las soluciones como fluidos de las digestiones, se utilizó NaOH 1 M y HCl 6 M.

Cuadro 2. Composición de las soluciones utilizadas como fluidos de las digestiones.

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

Para la digestión gástrica *in vitro*, se pesaron aproximadamente 5 g de cada formulación de chocolate y se mezclaron con 7,5 mL de SFG, se adicionaron 1,6 mL de solución de pepsina porcina de 25000 U/mL (se disolvió la pepsina en SFG), 5 µL de CaCl₂ 0,3 M y 0,8 mL de HCl 1 M para llegar a pH 3. Todo el procedimiento se realizó durante 2 horas con agitación constante, controlando la temperatura entre 36 y 37 °C y un valor de pH entre 2,9 y 3,1. Para la digestión pancreática *in vitro*, se adicionaron 11 mL de SFP a la solución resultante de la anterior digestión, luego se adicionaron 5 mL de solución de pancreatina de 800 U/mL (se disolvió la pancreatina con SFP), 2,5 mL de bilis al 0,5 %, 40 µL de CaCl₂ 0,3 M, 0,8 mL de NaOH 1 M para llegar a pH 7 y 0,3 mL de agua. Todo el procedimiento se realizó durante 2 horas con agitación constante, controlando la temperatura entre 36 y 37 °C y un valor de pH entre 6,9 y 7,1.

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

Determinación de la bioaccesibilidad del Cd

Se determinó la bioaccesibilidad del Cd (% Cd_{bio}) a partir de la Ecuación 1:

$$\% Cd_{bio} = \frac{[Cd_{bioaccesible}]}{[Cd_{total}]} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

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

Correlación de bioaccesibilidad de cadmio con componentes de formulaciones

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

Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo matemático de efectos lineales con interacciones como se presenta en la Ecuación 2.

$$Y = X_0 + X_A A + X_B B + X_C C + X_D D + X_{AB} AB + X_{AC} AC + X_{AD} AD + X_{BC} BC + X_{BD} BD + X_{CD} CD \quad (\text{Ec. 2})$$

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

Empleando la ecuación, se procedió a determinar las concentraciones de los componentes de la formulación de chocolate que posea menor valor en la bioaccesibilidad de Cd.

RESULTADOS

Los resultados mostraron que el valor promedio del % de bioaccesibilidad de Cd fue de 19,61 %; y los valores máximo y mínimo fueron de 32,56 y 7,22 % respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de bioaccesibilidad de cadmio en las formulaciones de chocolate obtenidas a través del diseño de experimentos.

Experimento	Cacao, g	Leche, g	Azúcar, g	[Cd] en cacao, mg/kg	[Cd] total, mg/kg	[Cd] bioaccesible, mg/kg	Bioaccesibilidad de Cd, %
1	3,00	0,00	2,00	1,23	0,74	0,14	18,92
2	3,00	0,00	4,00	1,23	0,53	0,10	18,87
3	3,00	2,00	3,00	1,23	0,46	0,10	21,74
4	3,00	4,00	2,00	1,23	0,41	0,10	24,39
5	3,00	4,00	4,00	1,23	0,34	0,08	23,53
6	5,00	0,00	3,00	1,23	0,77	0,10	12,99
7	5,00	2,00	2,00	1,23	0,69	0,12	17,39
8	5,00	2,00	3,00	1,23	0,63	0,11	17,46
9	5,00	2,00	3,00	1,23	0,63	0,12	19,05

10	5,00	2,00	4,00	1,23	0,58	0,10	17,24
11	5,00	4,00	3,00	1,23	0,53	0,12	22,64
12	7,00	0,00	2,00	1,23	0,97	0,07	7,22
13	7,00	0,00	4,00	1,23	0,80	0,08	10,00
14	7,00	2,00	3,00	1,23	0,71	0,09	12,68
15	7,00	4,00	2,00	1,23	0,66	0,13	19,70
16	7,00	4,00	4,00	1,23	0,58	0,09	15,52
17	3,00	0,00	2,00	1,23	0,75	0,14	18,67
18	3,00	0,00	4,00	1,23	0,54	0,11	20,19
19	3,00	2,00	3,00	1,23	0,46	0,10	21,74
20	3,00	4,00	2,00	1,23	0,42	0,10	23,81
21	3,00	4,00	4,00	1,23	0,34	0,07	20,59
22	5,00	0,00	3,00	1,23	0,77	0,10	12,99
23	5,00	2,00	2,00	1,23	0,67	0,12	17,91
24	5,00	2,00	3,00	1,23	0,62	0,10	16,13
25	5,00	2,00	3,00	1,23	0,62	0,12	19,35
26	5,00	2,00	4,00	1,23	0,56	0,11	19,64
27	5,00	4,00	3,00	1,23	0,52	0,12	23,08
28	7,00	0,00	2,00	1,23	0,94	0,07	7,45
29	7,00	0,00	4,00	1,23	0,77	0,08	10,39
30	7,00	2,00	3,00	1,23	0,72	0,09	12,50
31	7,00	4,00	2,00	1,23	0,66	0,12	18,18
32	7,00	4,00	4,00	1,23	0,57	0,10	17,54
33	3,00	0,00	2,00	6,63	3,98	0,87	21,86
34	3,00	0,00	4,00	6,63	2,84	0,62	21,83
35	3,00	2,00	3,00	6,63	2,49	0,67	26,91
36	3,00	4,00	2,00	6,63	2,21	0,69	31,22
37	3,00	4,00	4,00	6,63	1,81	0,45	24,86
38	5,00	0,00	3,00	6,63	4,14	0,69	16,67
39	5,00	2,00	2,00	6,63	3,68	0,80	21,74
40	5,00	2,00	3,00	6,63	3,32	0,70	21,08
41	5,00	2,00	3,00	6,63	3,32	0,70	21,08
42	5,00	2,00	4,00	6,63	3,01	0,64	21,26
43	5,00	4,00	3,00	6,63	2,76	0,73	26,45
44	7,00	0,00	2,00	6,63	5,16	0,53	10,27
45	7,00	0,00	4,00	6,63	4,22	0,52	12,32
46	7,00	2,00	3,00	6,63	3,87	0,58	14,99
47	7,00	4,00	2,00	6,63	3,57	0,80	22,41
48	7,00	4,00	4,00	6,63	3,09	0,60	19,42
49	3,00	0,00	2,00	6,63	3,98	0,88	22,11
50	3,00	0,00	4,00	6,63	2,84	0,64	22,54
51	3,00	2,00	3,00	6,63	2,49	0,65	26,10
52	3,00	4,00	2,00	6,63	2,21	0,66	29,86
53	3,00	4,00	4,00	6,63	1,81	0,46	25,41
54	5,00	0,00	3,00	6,63	4,14	0,68	16,43
55	5,00	2,00	2,00	6,63	3,68	0,81	22,01
56	5,00	2,00	3,00	6,63	3,32	0,67	20,18
57	5,00	2,00	3,00	6,63	3,32	0,73	21,99
58	5,00	2,00	4,00	6,63	3,01	0,67	22,26
59	5,00	4,00	3,00	6,63	2,76	0,72	26,09
60	7,00	0,00	2,00	6,63	5,16	0,52	10,08
61	7,00	0,00	4,00	6,63	4,22	0,55	13,03
62	7,00	2,00	3,00	6,63	3,87	0,60	15,50
63	7,00	4,00	2,00	6,63	3,57	0,77	21,57
64	7,00	4,00	4,00	6,63	3,09	0,62	20,06
65	3,00	0,00	2,00	9,11	5,49	1,14	20,77
66	3,00	0,00	4,00	9,11	3,87	0,85	21,96
67	3,00	2,00	3,00	9,11	3,38	0,90	26,63
68	3,00	4,00	2,00	9,11	3,01	0,93	30,90
69	3,00	4,00	4,00	9,11	2,52	0,63	25,00
70	5,00	0,00	3,00	9,11	5,71	0,92	16,11
71	5,00	2,00	2,00	9,11	5,06	1,09	21,54
72	5,00	2,00	3,00	9,11	4,57	0,96	21,01

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

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

Se realizó un análisis estadístico ANOVA a los valores obtenidos enmarcados en el modelo de la ecuación 2 para comparar la significancia de las variables en el modelo (Cuadro 4). Al comparar el valor P de cada variable se puede apreciar que solo la interacción BD, que corresponde a la cantidad de leche y a concentración de Cd en el cacao, no tiene efecto significativo (valor $p > 0,05$). Asimismo, se observa que las variables correspondientes a la cantidad de cacao y de leche son las que mayor influencia posee en el modelo inicial propuesto, debido a su valor F.

Cuadro 4. Resultado ANOVA de las variables del modelo inicial planteado.

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

Los efectos estandarizados del modelo inicial propuesto se pueden observar en el diagrama de Pareto (Figura 1). En la figura se corrobora que las variables correspondientes a cantidad de cacao y de leche son las de mayor influencia en el modelo. Sin embargo, la cantidad de cacao (que posee la mayor influencia en el modelo) tiene un efecto negativo en el %

bioaccesibilidad de Cd, mientras que la cantidad de leche y la concentración de Cd en cacao posee un efecto positivo, observándose en el signo negativo y positivo de cada efecto estandarizado, respectivamente (Figura 1).

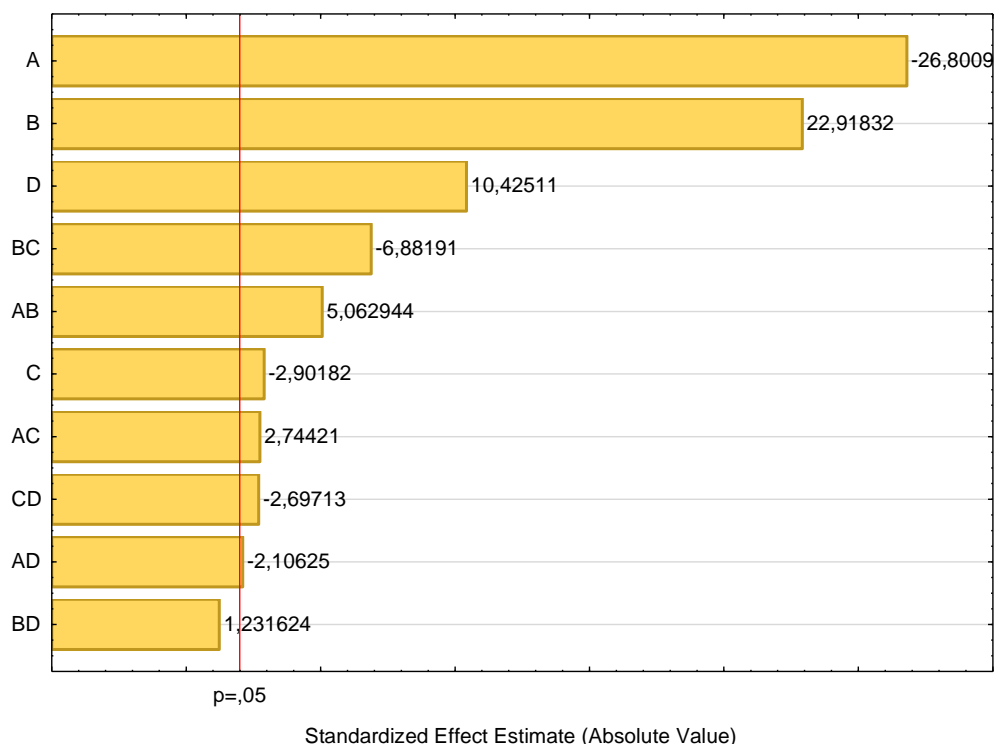


Figura 1. Diagrama de Pareto con los valores absolutos de los efectos estandarizados estimados para el modelo inicial planteado en la ecuación. Las variables A, B, C y D corresponden a cantidad de cacao, leche en polvo, azúcar y concentración de Cd en cacao respectivamente.

Efecto de la cantidad de cacao

Según los resultados, la cantidad de cacao en la formulación de chocolate aporta en el contenido de Cd total; por lo tanto, a mayor cantidad de cacao utilizado en la formulación, mayor contenido de Cd total en la formulación. Siguiendo la misma lógica, se esperaría que, a mayor cantidad de cacao, mayor contenido de Cd en la fase bioaccesible después de la digestión gastrointestinal; sin embargo, este efecto es contrario. Una de las razones por las que el efecto de la cantidad de cacao en el % de bioaccesibilidad de Cd sea inverso se debe, en parte, a la presencia de grasa en el cacao. La presencia de componentes no polares (grasa) en las formulaciones de chocolate impide la liberación de metales y moléculas polares en la fase polar y disminuye la probabilidad de ser bioaccesibles después de la digestión gastrointestinal (Martini *et al.*, 2018). Además, en la digestión pancreática hay presencia de bilis, que contribuye a la disolución y degradación de las grasas y, por ende, puede producir compuestos más pequeños que pueden atrapar metales o moléculas polares de menor tamaño en forma de micelas o complejos insolubles en la digestión. Esto disminuye la cantidad de Cd libre en la solución restante de la digestión y disminuye la concentración de Cd bioaccesible después de la digestión gastrointestinal (Peixoto *et al.*, 2016; Barraza *et al.*, 2017).

Efecto de la cantidad de leche

Teniendo en cuenta la cantidad de leche en polvo que se utilizó para la elaboración de las formulaciones; a medida que este valor incrementa, el % de bioaccesibilidad también

incrementa. Se corroboró que la leche en polvo no contribuye al contenido de Cd total a la formulación. Sin embargo, el contenido de aminoácidos polares y de ácidos orgánicos es elevado. La presencia de un componente polar de gran proporción en las formulaciones de chocolate como la leche y, sumado a esto, el alto contenido de acidez presente en ella ayuda a liberar más iones de Cd^{2+} en la fase polar y aumentar la probabilidad de ser bioaccesible después de la digestión gastrointestinal (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

Efecto de la cantidad de azúcar

Para la cantidad de azúcar que se utilizó en la elaboración de las formulaciones; a medida que este valor se incrementó, teniendo constantes las demás variables de la formulación, el % de bioaccesibilidad disminuyó. Aunque el efecto de la cantidad de azúcar es pequeño en comparación al efecto de las otras variables (Figura 1), ésta es una variable significativa en el modelo inicial propuesto. Este efecto puede ser atribuido a la formación de complejos de Cd insolubles con la sacarosa y otros endulzantes en la fase intestinal de la digestión, reduciendo la concentración de Cd bioaccesible y, por ende, el % de bioaccesibilidad de Cd (Peixoto *et al.*, 2016).

Efecto de la concentración de Cd en el cacao

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

Modelo matemático

De acuerdo con lo anterior, los datos se ajustaron a un nuevo modelo corregido de efectos lineales con interacciones, eliminando la interacción BD (cantidad de leche y [Cd] en cacao) la cual no fue significativa (Ecuación 3)

$$Y = 24,92 - 3,20A + 2,67B + 0,22C + 1,09D + 0,23AB + 0,25AC - 0,05AD - 0,64BC - 0,14CD \quad (\text{Ec. 3})$$

El modelo ajustado explicó el comportamiento de los datos experimentales en un 94,01 % observándose una tendencia lineal entre los datos experimentales y los calculados con el modelo ajustado (Figura 2).

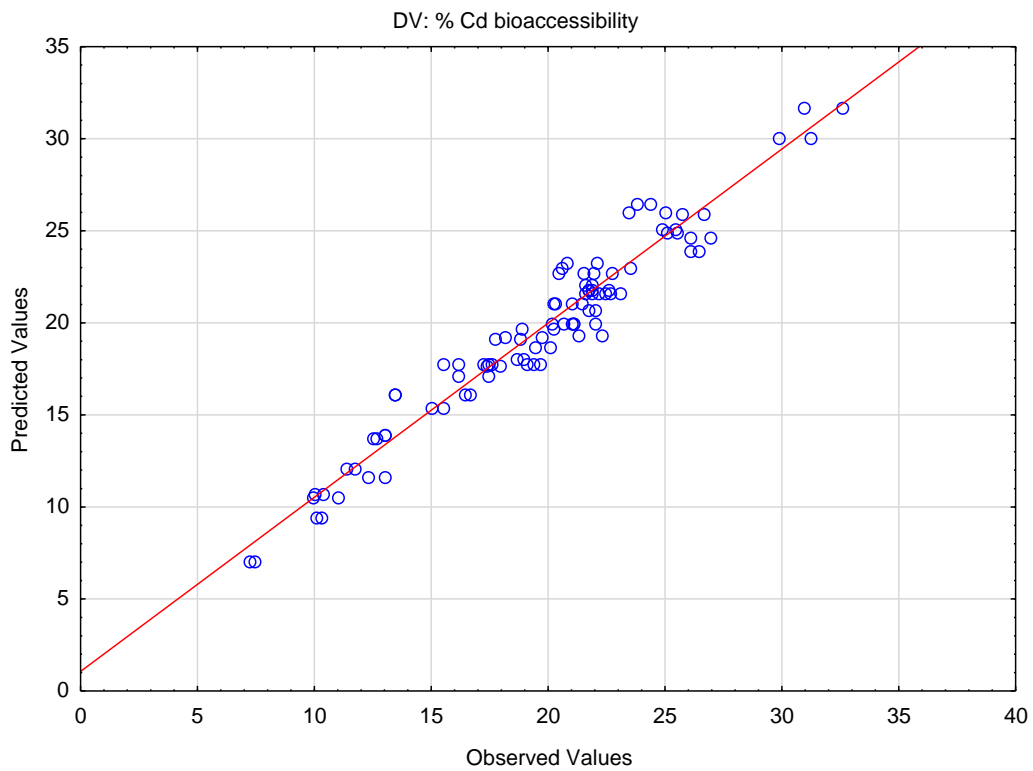


Figura 2. Gráfica de valores observados con respecto a valores predichos con el modelo ajustado para el % bioaccesibilidad. de Cd.

En la superficie de respuesta se puede observar una tendencia de los datos similares a la reportada en la gráfica de Pareto, con una disminución del % bioaccesibilidad Cd cuando la cantidad de cacao aumenta, y un aumento en el % bioaccesibilidad cuando las cantidades de leche aumentan (Figura 3).

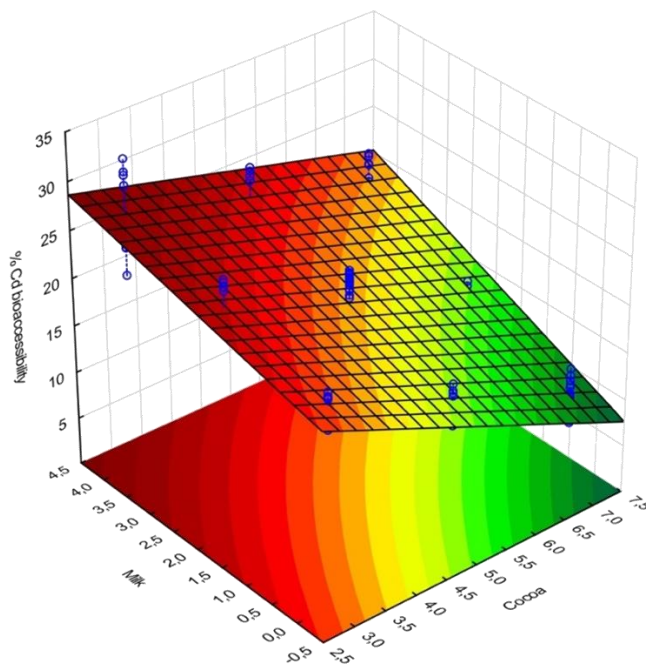


Figura 3. Superficie de respuesta del modelo ajustado graficando % de bioaccesibilidad de Cd en función de cantidad de leche y cacao, manteniendo las otras dos variables fijas a mitad del valor.

Valor mínimo de bioaccesibilidad

Una vez obtenido el modelo matemático para describir el comportamiento del % bioaccesibilidad de Cd en las formulaciones de chocolate; se calcularon los valores de las variables que corresponden a formulaciones con el valor mínimo de bioaccesibilidad de Cd de 7,07 %, donde se obtuvo una formulación con 7 g de cacao, 0 g de leche y 2 g de azúcar, utilizando un cacao de 1,23 mg/kg de Cd. Así mismo, otros valores mínimos se calcularon para formulaciones de chocolate con otras concentraciones de Cd en el cacao y mayor cantidad (Cuadro 5). También, se obtuvo el valor experimental de la formulación de chocolate propuesta por el modelo ajustado, obteniéndose un error de 2,08 %.

Cuadro 5. Puntos experimentales de valor mínimo de % de bioaccesibilidad de Cd utilizando cacao de [Cd] conocida.

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

Estos resultados muestran que las formulaciones de chocolate, para cualquier concentración de Cd del cacao utilizado dentro del intervalo del modelo (Cuadro 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), que poseen menor valor de % de bioaccesibilidad de Cd corresponden a chocolate negro o amargo (*dark chocolate*); donde el alto contenido de grasa puede favorecer a la retención del Cd en la digestión gastrointestinal, y la ausencia de compuestos ácidos, como la leche, puede evitar la liberación del Cd en su forma bioaccesible.

Evaluación del modelo

Se realizó la evaluación del modelo ajustado obtenido utilizando varias formulaciones diferentes a los puntos experimentales utilizados para el modelo. De los datos obtenidos, se calculó el error del valor predicho por el modelo para 10 formulaciones experimentales donde se obtuvieron errores de 8,84 % en promedio (Cuadro 6).

Cuadro 6. Puntos experimentales de formulaciones de chocolate para la validación del modelo ajustado.

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

El modelo se ajustó para las variables estipuladas en la elaboración de las formulaciones de chocolate; sin embargo, el modelo puede aplicarse para grandes cantidades de cacao, leche y azúcar (A, B y C respectivamente) siempre y cuando se mantenga la proporción estipulados para este modelo (Cuadro 1). Esta afirmación se sustenta en resultados obtenidos (Cuadro 6) para formulaciones de mayor masa; por ejemplo, para una formulación de 4 kg, el valor experimental y predicho de bioaccesibilidad de Cd fueron 15,22 y 13,45%, respectivamente, diferencia que representa tan solo un 11,64 % de error.

Comparación con otros valores

Los valores obtenidos de % de bioaccesibilidad de Cd para esta investigación se compararon con otros resultados de otros autores (Cuadro 7). Si bien, las matrices utilizadas en los otros trabajos no son las mismas, utilizan como base cacao en los productos elaborados.

Cuadro 7. Comparación del % de bioaccesibilidad de Cd con otros autores.

Valor	Bioaccesibilidad de Cd, %		
	Chocolate (Este trabajo)	Licor de cacao (Barraza <i>et al.</i> 2017)	Polvo de bebida de chocolate (Peixoto <i>et al.</i> 2016)
Promedio	19,61 ± 5,25	99,2 ± 4,13	6,5 ± 3,04

Menor	7,22	91,0	3,0
Mayor	32,56	106,2	11,1

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

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

CONCLUSIONES

Se obtuvo un modelo matemático para correlacionar el % bioaccesibilidad de cadmio con los componentes cacao, leche, azúcar y concentración de Cd total en el cacao; donde explicó el comportamiento de los datos experimentales con los datos predichos en un 94,01 % y la evaluación del modelo mostró errores de 8,84 % en promedio. En el modelo se encontró efecto significativo en todas las contribuciones lineales; observándose efectos negativos en la cantidad de cacao y azúcar, y efectos positivos en la cantidad de leche y la concentración de Cd en cacao. La contribución lineal de la cantidad de cacao y la cantidad de leche fueron las variables más significativas en el modelo. Se propuso una formulación con 77,8 % de cacao y 22,2 % de azúcar, que corresponde a un chocolate amargo, con un % bioaccesibilidad de Cd de 7,07 %. Además, utilizando cacao de concentración de Cd dentro del intervalo del modelo, se propuso formulaciones que corresponde a chocolate amargo (*dark chocolate*) que poseen % de bioaccesibilidad de Cd predichos menores al 11 %. Los presentes resultados orientan al productor y comercializador a conocer las formulaciones de cacao pertinentes a disminuir la exposición y toxicidad de Cd, con granos de cacao que posean alto contenido de Cd provenientes de regiones del Santander.

REFERENCIAS

- ABT, EILEEN; SAM, JENNIFER-FONG; GRAY, PATRICK; ROBIN, LAUREN POSNICK. Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, v. 11, n. 2, 2018, p. 92–102.
<https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1420700>
- ABT, EILEEN; ROBIN, LAUREN-POSNICK. Perspective on Cadmium and Lead in Cocoa and Chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, n. 46, 2020, p. 13008–13015.
<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08295>
- ALVES, RICARDO N.; MAULVAULT, ANA L.; BARBOSA, VERA L.; FERNANDEZ-TEJEDOR, MARGARITA; TEDIOSI, ALICE; KOTTERMAN, MICHIEL; VAN DEN HEUVEL,

- FREDERICUS H.M.; ROBBENS, JOHAN; FERNANDES, JOSÉ O.; RASMUSSEN, RIE-
ROMME; SLOTH, JENS J.; MARQUES, ANTÓNIO. Oral bioaccessibility of toxic and
essential elements in raw and cooked commercial seafood species available in European
markets. *Food Chemistry*, v. 267, 2018, p. 15-27.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.045>
- ARÉVALO-GARDINI, ENRIQUE; ARÉVALO-HERNÁNDEZ, CESAR O.; BALIGAR, VIRUPAX
C.; HE, ZHENLI L. Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma
cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of The Total Environment*, v.
605-606, 2017, p. 792-800.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>
- BARRAZA, F.; SCHRECK, E.; LÉVEQUE, T.; UZU, G.; LÓPEZ, F.; RUALES, J.; PRUNIER, J.;
MARQUET, A.; MAURICE, L. Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in
cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental
Pollution*, v. 229, 2017, p. 950-963.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>
- BARRAZA, FIORELLA; SCHRECK, EVA; UZU, GAËLLE; LÉVEQUE, THIBAUT; ZOUTEN,
CYRIL; BOIDOT, MATHIEU; MAURICE, LAURENCE. Beyond cadmium accumulation:
Distribution of other trace elements in soils and cacao beans in Ecuador. *Environmental
Research*, v. 192, 2021, p. 110241.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110241>
- BHAT, ZUHAIB F.; MORTON, JAMES D.; MASON, SUSAN L.; BEKHIT, ALAA EL-DIN A.;
MUNGUREB, TANYARADZWA E. Pulsed electric field: Effect on in-vitro simulated
gastrointestinal protein digestion of deer *Longissimus dorsi*. *Food Research International*,
v. 120, 2018, p. 793-799.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.040>
- CHAPARRO-ACUÑA, SANDRA-PATRICIA; VARGAS-MORENO, PAOLA-ANDREA; SILVA-
GÓMEZ, LEONARDO-ANDRÉS; CÁRDENAS, OSWALDO-ELIÉCER. Cadmium
voltametric quantification in table chocolate produced in Chiquinquirá-Boyaca, Colombia.
Acta Agronómica, v. 66, n. 2, 2017, p. 172-177.
<http://dx.doi.org/10.15446/acag.v66n2.5847>
- DE OLIVEIRA, VINICIUS-HENRIQUE; ULLAH, IHSAN; DUNWELL, JIM M.; TIBBETT, MARK.
Bioremediation potential of Cd by transgenic yeast expressing a metallothionein gene
from *Populus trichocarpa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 202, 2020, p.
110917.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110917>
- ECHEVERRY, A.; REYES, H. Determinación de la concentración de cadmio en un chocolate
colombiano con 65 % de cacao y chocolates extranjeros con diferentes porcentajes de
cacao. *Entre Ciencia e Ingeniería*, v. 19, 2016, p. 22-32.
<https://revistas.ucp.edu.co/index.php/entrecienciaeingenieria/article/view/452>
- FEBRIANTO, NOOR-ARIEFANDIE; XHU, FAN. Changes in the Composition of
Methylxanthines, Polyphenols, and Volatiles and Sensory Profiles of Cocoa Beans from
the Sul 1 Genotype Affected by Fermentation. *Journal of Agricultural and Food
Chemistry*, v. 68, n. 32, 2020, p. 8658-8675.
<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02909>
- FRANCISCO, JOÃO; CARDOSO, CARLOS; BANDARRA, NARCISA; BRITO, PEDRO; HORTA,
ANDRÉ; PEDROSA, RUI; GIL, MARIA M.; DELGADO, INÉS-MARGARIDA;
CASTANHEIRA, ISABEL; AFONSO, CLÁUDIA. Bioaccessibility of target essential
elements and contaminants from *Fucus spiralis*. *Journal of Food Composition and
Analysis*, v. 74, 2018, p. 10-17.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.08.003>

- GRAMLICH, A.; TANDY, S.; ANDRES, C.; CHINCHEROS-PANIAGUA, J.; ARMENGOT, L.; SCHNEIDER, M.; SCHULIN, R. Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of The Total Environment*, v. 580, 2017, p. 677-686.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014>
- GRAMLICH, A.; TANDY, S.; GAUGGEL, C.; LÓPEZ, M.; PERLA, D.; GONZALEZ, V.; SCHULIN, R. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of The Total Environment*, v. 612, 2018, p. 370-378.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>
- GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, MINE; BERKTAŞ, IJLAL; ÖZÇELİK, BERAAT. Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. *LWT - Food Science and Technology*, v. 72, 2016, p. 559-565.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.065>
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, RAQUEL; NAVARRO-BLASCO, IÑIGO. Estimation of dietary intake and content of lead and cadmium in infant cereals marketed in Spain. *Food Control*, v. 26, n. 1, 2012, p. 6-14.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.024>
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics Cocoa Year 2016/17. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, v. 43, n. 1, 2019, p. 1-147.
- KASA, NURSU-AYLIN; BÜYÜKPINAR, ÇAĞDAŞ; ERULAŞ, AHMET-FATİH; BAKIRDERE, SEZGIN. A sensitive and accurate analytical method for the determination of cadmium in food samples: Molybdenum coated T-shape slotted quartz tube flame atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*, v. 319, 2020, p. 126572.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126572>
- LEWIS, CALEB; LENNON, ADRIAN M.; EUDOXIE, GAIUS; SIVAPATHAM, PARAMASIVAM; UMAHARAN, PATHMANATHAN. Plant metal concentrations in Theobroma cacao as affected by soil metal availability in different soil types. *Chemosphere*, v. 262, 2021, p. 127749.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127749>
- LO DICO, GIANLUIGI-MARIA; GALVANO, FABIO; DUGO, GIACOMO; D'ASCENZI, CARLO; MACALUSO, ANDREA; VELLA, ANTONIO; GIANGROSSO, GIUSEPPE; CAMMILERI, GAETANO; FERRANTELLI, VINCENZO. Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food Chemistry*, v. 245, 2018, p. 1163-1168.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.052>
- MARTINI, SERENA; CONTE, ANGELA; TAGLIAZUCCHI, DAVIDE. Bioaccessibility, bioactivity and cell metabolism of dark chocolate phenolic compounds after in vitro gastro-intestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, v. 49, 2018, p. 424-436.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.005>
- MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALANCE, S. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, v. 5, n. 6, 2014, p. 1113-1124.
<https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; ANDREY, D.; BLAKE, C.; LOBINSKI, R. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additives and Contaminants*, v. 20, n. 4, 2003, p. 343-352.
<http://dx.doi.org/10.1080/0265203031000077888>
- PEIXOTO, RAFAELLA R.A.; DEVESA, VICENTA; VÉLEZ, DINORAZ; CERVERA, M. LUISA; CADOREA, SOLANGE. Study of the factors influencing the bioaccessibility of 10

- elements from chocolate drink powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 48, 2016, p. 41-47.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.02.002>
- PEIXOTO, RAFAELLA R.A.; OLIVEIRA, ANDREA; CADORE, SOLANGE. Risk assessment of cadmium and chromium from chocolate powder. *Food Additives & Contaminants: Part B*, v. 11, n. 4, 2018, p. 256–263.
<https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1499676>
- PICO-HERNÁNDEZ, SERGIO M.; JAIMES-ESTÉVEZ, JAIME; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS J.; MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN J. Supercritical extraction of bioactive compounds from Cocoa husk: study of the main parameters. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, v. 91, 2019, p. 95-105.
<http://dx.doi.org/10.17533/udea.redin.n91a09>
- RECKNAGEL, SEBASTIAN; KOCH, MATTHIAS; KÖPPEN, ROBERT; BUTTLER, SABINE; PENK, SIBYLLE; MAUCH, TATJANA; SOMMERFELD, THOMAS; WITT, ANGELIKA. Development of certified reference materials for the determination of cadmium and acrylamide in cocoa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 412, n. 19, 2020, p. 4659-4668.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02719-0>
- SATARUG, SOISUNGWAN; VESEY, DAVID A.; GOBE, GLENDA C. Current health risk assessment practice for dietary cadmium: Data from different countries. *Food and Chemical Toxicology*, v. 106, 2017, p. 430-445.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.013>
- TORO-URIBE, SAID; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER; ALVAREZ-RIVERA, GERARDO; IBÁÑEZ, ELENA; HERRERO, MIGUEL. Insight of Stability of Procyanidins in Free and Liposomal Form under an *in Vitro* Digestion Model: Study of Bioaccessibility, Kinetic Release Profile, Degradation, and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 7, 2019, p. 1990-2003.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b00351>
- VILLAMIZAR-JAIMES, ARLEY-RENÉ; LÓPEZ-GIRALDO, LUIS-JAVIER. Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Respuestas*, v. 22, n. 1, 2017, p. 75-83.
<https://doi.org/10.22463/0122820X.821>
- ZHUANG, PING; ZHANG, CHAOSHENG; LI, YINGWEN; ZOU, BI; MO, HUI; WU, KEJUN; WU, JINGTAO; LI, ZHIAN. Assessment of influences of cooking on cadmium and arsenic bioaccessibility in rice, using an *in vitro* physiologically-based extraction test. *Food Chemistry*, v. 213, 2016, p. 206-214.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.066>