



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Análisis de metales pesados en muestras de chocolate mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

Analysis of heavy metals in chocolate samples using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

Autor/es

Raquel Fernández Meseguer

Director/es

Susana Lorán Ayala
Ana María Rua Ibarz

Facultad de Veterinaria

2025

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
1. Seguridad alimentaria: Un desafío global.....	3
2. Contaminación de alimentos por metales	5
3. Toxicidad de los metales.....	10
4. Exposición dietética a metales pesados	12
5. Importancia del cacao y el chocolate	14
6. Contaminación del cacao por metales pesados	16
7. Prevención y control de la contaminación por metales pesados del cacao y sus productos derivados.....	19
8. Métodos de análisis de metales en alimentos: El papel del ICP-MS.....	20
OBJETIVOS DEL TRABAJO	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. Muestreo y tratamiento previo al ensayo	23
2. Preparación del material y de los estándares de calibración.....	23
3. Digestión	24
4. Preparación de las disoluciones de medida de las muestras	25
5. Determinación de metales por ICP-MS	26
5. 1. Isótopos seleccionados para la determinación	26
5. 2. Condiciones instrumentales	27
6. Validación del método	28
7. Procesamiento de datos	30
8. Estimación de la ingesta de metales por consumo de chocolate	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
1. Validación del método	32
2. Presencia de metales en las muestras analizadas	34
3. Contribución del consumo de chocolate a la exposición a metales.....	41
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44

RESUMEN

El chocolate es un alimento de consumo habitual en todo el mundo y una fuente potencial de exposición dietética a metales pesados, debido a la capacidad del cacao para acumular elementos como cadmio, plomo, arsénico o mercurio. Dado que algunos de estos compuestos presentan toxicidad crónica y relevancia regulatoria, su estudio resulta esencial en el ámbito de la seguridad alimentaria.

El objetivo de este trabajo fue validar un método analítico para la determinación de metales esenciales y tóxicos en tabletas de chocolate comercializadas en España, y aplicar dicho método para evaluar la presencia de estos elementos en las muestras analizadas.

Se analizaron 30 muestras de chocolate con diferentes porcentajes de cacao (70 – 99 %). Las muestras fueron sometidas a digestión ácida y posteriormente se cuantificaron los elementos mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El método fue validado en términos de linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad, demostrando ser adecuado para la determinación de metales en esta matriz, si bien el plomo presentó recuperaciones sistemáticamente elevadas y una desviación estándar relativamente alta, por lo que los resultados deben interpretarse con cautela.

Los resultados mostraron que el cadmio fue el metal detectado con mayor frecuencia y en concentraciones más elevadas en comparación con otros contaminantes, aunque siempre dentro de los límites legales establecidos. El plomo se detectó en concentraciones bajas, mientras que el arsénico y el mercurio estuvieron presentes en niveles muy reducidos. En cuanto a los metales esenciales, el manganeso y el hierro se encontraron en cantidades apreciables, mientras que el cobre y el zinc también se detectaron con una notable variabilidad entre productos, lo que refleja la influencia de factores como el origen del cacao o los procesos de elaboración.

En conclusión, el método desarrollado resultó válido para el análisis de metales en chocolate y permitió evidenciar que, si bien la contaminación por cadmio debe ser objeto de seguimiento, las muestras analizadas cumplen la legislación vigente. Estos resultados ponen de relieve la importancia de controlar este tipo de contaminantes en productos de consumo habitual y, al mismo tiempo, confirman que el chocolate puede contribuir a la ingesta de determinados metales esenciales, aspecto de interés para la salud pública.

ABSTRACT

Chocolate is a widely consumed food worldwide and a potential source of dietary exposure to heavy metals, due to the ability of cocoa to accumulate elements such as cadmium, lead, arsenic, or mercury. Since some of these compounds present chronic toxicity and regulatory relevance, their study is essential in the field of food safety.

The aim of this work was to validate an analytical method for the determination of essential and toxic metals in chocolate bars commercialized in Spain, and to apply this method to evaluate the presence of these elements in the analyzed samples.

A total of 30 chocolate samples with different cocoa percentages (70 – 99%) were analyzed. Samples were subjected to acid digestion and subsequently the elements were quantified by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The method was validated in terms of linearity, precision, accuracy, and sensitivity, proving to be suitable for the determination of metals in this matrix. However, lead showed systematically elevated recoveries and relatively high standard deviation, suggesting possible interferences that should be interpreted with caution.

The results showed that cadmium was the most frequently detected metal and in the highest concentrations compared to other contaminants, although always below the established legal limits. Lead was detected at low concentrations, while arsenic and mercury were found at very low levels. Regarding essential metals, manganese and iron were present in appreciable amounts, while copper and zinc also showed notable variability among products, reflecting the influence of factors such as the geographical origin of cocoa or processing differences.

In conclusion, the developed method proved valid for the analysis of metals in chocolate and demonstrated that, although cadmium contamination should continue to be monitored, the analyzed samples comply with current legislation. These results highlight the importance of controlling this type of contaminants in commonly consumed products, while also confirming that chocolate can contribute to the intake of certain essential metals, an aspect of particular interest for public health.

INTRODUCCIÓN

1. Seguridad alimentaria: Un desafío global

La seguridad alimentaria es un pilar esencial para garantizar la salud pública y el desarrollo sostenible de las sociedades. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agricultural Organization*), "la seguridad alimentaria se consigue cuando todas las personas en todo momento tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana" (FAO, 1996). Este concepto depende de cuatro factores fundamentales: disponibilidad, acceso, estabilidad e inocuidad alimentaria. Concretamente, el concepto de inocuidad alimentaria hace referencia a la ausencia (o presencia en niveles seguros y aceptables) de peligros en los alimentos que puedan causar efectos adversos en la salud del consumidor, siempre que se preparen y consuman de forma adecuada.

La pérdida de inocuidad alimentaria tiene consecuencias significativas a nivel mundial. Se estima que cada año enferman unos 600 millones de personas por consumir alimentos contaminados, de las cuales 420.000 mueren. Los niños menores de 5 años soportan el 40 % de la carga de enfermedades transmitidas por los alimentos, con 125.000 muertes cada año. Además, en los países de ingresos bajos y medianos, cada año se destinan más de 100 millones de euros a cubrir los gastos médicos derivados del consumo de alimentos contaminados (OMS, 2023).

En Europa, las enfermedades zoonóticas transmitidas por los alimentos representan una preocupación significativa. Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*), en 2023 se produjeron 5.691 brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en la Unión Europea. Esto supuso un ligero descenso en comparación con el año anterior. Las principales enfermedades fueron la campilobacteriosis y la salmonelosis (EFSA, 2023).

Los datos sobre enfermedades transmitidas por alimentos suelen referirse a contaminantes de origen biológico, ya que habitualmente producen toxicidad aguda. Sin embargo, los contaminantes químicos también representan un riesgo significativo por su potencial para generar efectos adversos en la salud del consumidor. Su impacto en la salud varía según el tipo

de compuesto y la cantidad ingerida. Si bien en algunos casos pueden provocar toxicidad aguda cuando se consumen en dosis elevadas en un corto período de tiempo, en la mayoría de los casos, los efectos de la exposición a contaminantes químicos no se manifiestan de inmediato, sino que aparecen tras una exposición prolongada a pequeñas dosis del compuesto. Es decir, producen una toxicidad crónica (Elika, 2023).

Los agentes de peligro de naturaleza química que se encuentran en los alimentos pueden tener origen natural, si bien han sido las actividades industriales, agrícolas y mineras las que han contribuido a incrementar significativamente la presencia de sustancias tóxicas en el medio ambiente. Estas sustancias pueden acumularse en los ecosistemas e introducirse en la cadena alimentaria. Entre los peligros químicos de mayor relevancia en piensos y alimentos se encuentran:

- **Toxinas:** Son compuestos nocivos producidos de forma natural por algunos organismos que pueden contaminar los alimentos o el medio del que estos proceden. Una vez generadas, habitualmente estas sustancias no pueden eliminarse mediante procesos convencionales de cocinado o conservación, lo que las convierte en un riesgo significativo para la salud. Un ejemplo son las micotoxinas, como las aflatoxinas o las fumonisinas, producidas por ciertos mohos en cereales, frutos secos y otros productos durante la cosecha o posteriormente cuando estos alimentos son almacenados en condiciones de humedad. Otro caso son las biotoxinas marinas, como el ácido domoico, generadas por microalgas en ambientes marinos, que pueden acumularse en moluscos bivalvos y provocar intoxicaciones graves en los consumidores.
- **Contaminantes medioambientales:** Son sustancias que se liberan al aire, al agua o al suelo, a menudo como resultado de actividades antropogénicas. Contaminan el medio natural hasta llegar a los alimentos. Ejemplos de contaminantes ambientales son los metales pesados, que pueden persistir en el medio ambiente y acumularse tanto en los suelos como en los organismos vivos, entrando así en la cadena alimentaria; los nitratos procedentes de excretas orgánicas y/o de los fertilizantes utilizados en la agricultura o las dioxinas y PCBs que proceden de la actividad industrial y se acumulan en los tejidos grasos, por lo que sobre todo están presentes en los alimentos de origen animal. Recientemente, es motivo de preocupación el aumento de micropartículas de plásticos, principalmente en los mares, ya que suponen un peligro para las especies marinas, y pueden estar presentes en alimentos procedentes de la pesca (EFSA, 2023; Elika, 2023).

- **Contaminantes de proceso:** Son sustancias químicas que se generan durante las distintas etapas de la producción, transformación, preparación o almacenamiento de los alimentos. Su origen puede estar relacionado con tratamientos térmicos (como la formación de acrilamida o hidrocarburos aromáticos policíclicos durante el cocinado a altas temperaturas) o con la migración de materiales en contacto con los alimentos (como ftalatos o bisfenol A desde plásticos o envases). También se incluyen otras sustancias generadas por reacciones químicas en el procesado, como los furanos, el 3-MCPD, el glicidol y sus ésteres. Estos contaminantes representan un riesgo para la salud si se ingieren en cantidades significativas, por lo que su presencia está regulada por la legislación alimentaria europea y otras agencias internacionales.
- **Residuos.** De productos fitosanitarios y de tratamientos veterinarios.

En el contexto de un mundo globalizado, los riesgos relacionados con la contaminación alimentaria han incrementado debido a la creciente complejidad de las cadenas de suministro, el aumento del comercio internacional y la movilidad global de mercancías. Estos factores amplifican la probabilidad de que contaminantes presentes en un punto de origen lleguen a consumidores en todo el mundo. La globalización de las cadenas alimentarias y el incremento del comercio internacional han intensificado la interconexión entre sistemas de producción y distribución alimentaria, lo que puede aumentar la exposición humana a contaminantes químicos como los metales pesados, plaguicidas y dioxinas (OMS, 2023).

2. Contaminación de alimentos por metales

El cuerpo humano necesita pequeñas cantidades de ciertos metales, como hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu) y zinc (Zn), para llevar a cabo diversas funciones fisiológicas y bioquímicas. No obstante, estos elementos esenciales también pueden convertirse en contaminantes cuando están presentes en los alimentos en niveles excesivos. Por ejemplo, el Mn, aunque esencial, puede interferir con la absorción de otros nutrientes cuando se encuentra en altas concentraciones. Entre las causas que pueden originar un incremento de la concentración de estos elementos en los alimentos están tanto su presencia natural en el entorno como su introducción a través de fuentes antrópicas entre las que se encuentran la actividad industrial y minera, el uso de fertilizantes y enmiendas orgánicas, así como el riego con aguas contaminadas. Por ejemplo, Cu y Zn son comúnmente utilizados en fertilizantes y pesticidas, lo que puede aumentar su concentración en suelos agrícolas (Alloway, 2013). En exceso, el Fe

puede oxidarse y acumularse en cultivos de arroz, especialmente en suelos encharcados, afectando tanto la calidad como la seguridad alimentaria (Fageria, 2009).

Por otro lado, es motivo de preocupación la presencia en los alimentos de metales pesados como el arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg). Estos elementos, que se encuentran de forma natural en la corteza terrestre, se originan a partir de procesos geológicos como la erosión o la actividad volcánica. En algunas regiones, los suelos y las aguas subterráneas contienen concentraciones naturalmente elevadas de ciertos metales pesados, lo que puede influir en su presencia en los ecosistemas locales. Sin embargo, las actividades humanas han incrementado significativamente sus concentraciones en el entorno. La minería y la industria metalúrgica son las actividades que en mayor medida contribuyen a la liberación de estos metales al aire, agua y suelo; la quema de combustibles fósiles añade partículas de Pb y Hg a la atmósfera.

La agricultura intensiva, a través del uso de fertilizantes y pesticidas, puede introducir Cd y otros metales en los suelos cultivables. Además, la eliminación inadecuada de residuos industriales y electrónicos representa otra fuente importante de contaminación ambiental por metales pesados (EFSA, 2023).

En un estudio llevado a cabo por el Instituto de Salud Carlos III y el Instituto Geológico y Minero de España (Núñez et al., 2017) se analizaron datos de más de 860.000 muertes por 27 tipos de cáncer registradas entre 1999 y 2008 en 7.917 municipios, comparándolos con las concentraciones de metales pesados detectadas en el suelo superficial. Aunque las asociaciones encontradas no prueban una relación causal directa, el trabajo destaca la posible influencia de la contaminación del suelo en la salud pública por exposición prolongada a metales pesados y su incorporación a la cadena alimentaria.

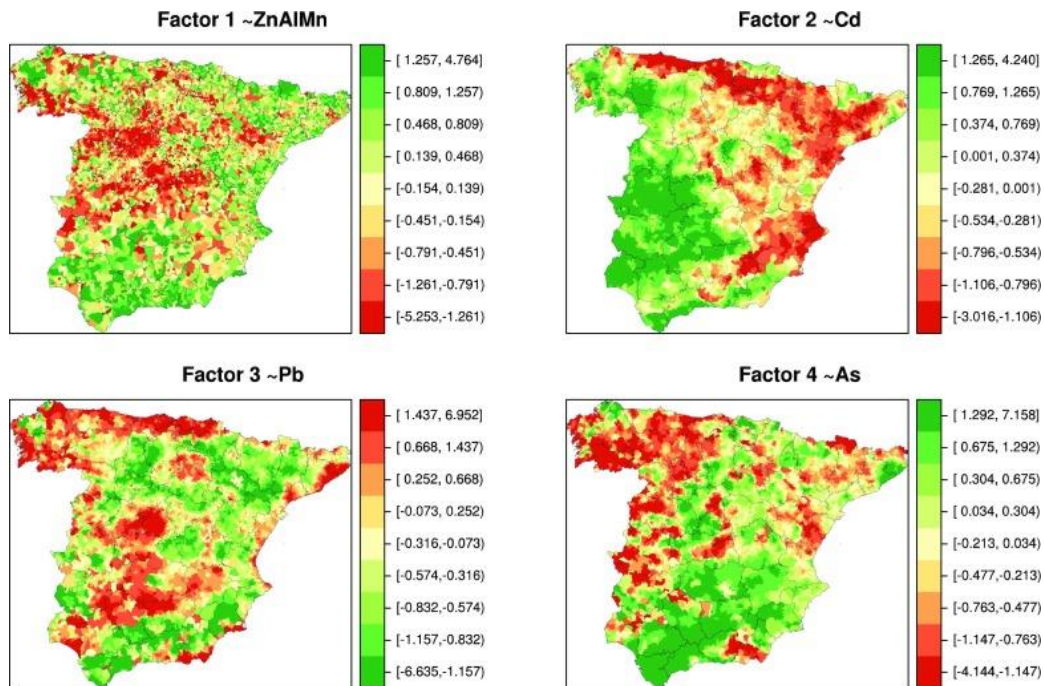


Gráfico 1. Distribución de metales pesados en el suelo de los municipios españoles. Fuente RTVE.ES

Los alimentos pueden contaminarse con metales pesados de diversas maneras:

- Absorción por plantas:** Las plantas pueden absorber metales pesados presentes en suelos contaminados o procedentes del riego con aguas contaminadas. Esto afecta a cultivos como cereales, hortalizas y frutas. El arroz, por ejemplo, tiene una elevada capacidad para acumular As inorgánico en condiciones de inundación, debido a que este elemento se moviliza fácilmente en suelos anóxicos bajo formas químicas biodisponibles, y la planta presenta una alta eficiencia de transporte hacia el grano (Meharg and Zhao, 2012). Por su parte, el cacao es especialmente propenso a acumular Cd, incluso cuando este se encuentra en concentraciones moderadas en el suelo. Esta planta puede absorber el Cd a través de sistemas radiculares finos que favorecen su captación desde la fracción intercambiable del suelo, lo que ha sido ampliamente documentado en regiones tropicales con suelos naturalmente ricos o contaminados por fertilizantes fosfatados (Arévalo-Gardini et al., 2017). Estas características fisiológicas específicas explican en parte por qué algunos alimentos contribuyen más que otros a la exposición dietética a metales pesados. Un estudio llevado a cabo en Turquía evaluó la acumulación de Pb, Cd y As en diferentes vegetales de hoja cultivados cerca de zonas industriales, y concluyó que varias muestras superaban los límites máximos permitidos, suponiendo un riesgo potencial para la salud del consumidor (Uluozlu et al., 2019). Asimismo, en China, investigaciones realizadas en 2020 analizaron la acumulación de metales pesados en vegetales cultivados en suelos con diferentes niveles

de contaminación y observaron una mayor concentración en cultivos de raíces y hojas, destacando la espinaca y el rábano como especies de mayor riesgo (Zhao et al., 2020).

- **Bioacumulación en animales:** Los animales pueden ingerir metales pesados al consumir agua o alimentos contaminados. Estos metales pueden acumularse en distintos tejidos, como el hígado, los riñones o los músculos, debido a su baja tasa de eliminación. La excreción de metales pesados se produce principalmente a través de la orina y la bilis, pero también puede darse a través de la leche materna en especies lactantes, lo que supone un riesgo adicional para las crías. Estudios recientes han detectado la presencia de Pb en productos lácteos, como la leche, particularmente en regiones próximas a fuentes industriales. Por ejemplo, una investigación realizada en Perú en 2023 halló que la leche producida en áreas cercanas a zonas mineras presentaba niveles de Pb que superaban en algunos casos los límites establecidos internacionalmente. El estudio advirtió que el índice de riesgo para niños superaba los valores de referencia, indicando un riesgo potencial para su salud (Castro-Bedriñana et al., 2023). Asimismo, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) incluye a la leche entre los alimentos que pueden contribuir a la exposición dietética al Pb, aunque su contribución se considera moderada comparada con cereales o verduras (AESAN, 2023).

Además, se ha observado la acumulación de Cd en moluscos y crustáceos, especialmente en mejillones y ostras, los cuales actúan como bioacumuladores naturales de metales presentes en su entorno marino (FAO, 2021). Por su parte, algunas especies de algas comestibles, ampliamente utilizadas en la cocina asiática y en productos veganos, han mostrado niveles elevados de As inorgánico, lo que ha motivado restricciones en varios países sobre su consumo frecuente (EFSA, 2018).

En ambientes acuáticos, los peces y mariscos pueden acumular mercurio en forma de metilmercurio, altamente tóxico. Este compuesto, resultado de procesos de metilación microbiana del mercurio inorgánico, tiene una elevada afinidad por los lípidos y una gran capacidad de atravesar barreras biológicas, como la placentaria y la hematoencefálica. Especies depredadoras como el atún, pez espada y tiburón tienden a acumularlo en sus tejidos debido a su longevidad y posición alta en la cadena trófica. Un análisis de muestras de atún en conserva comercializadas en Europa reveló que hasta el 10 % de las muestras contenían niveles de Hg superiores a los permitidos (Bloom y Foodwatch, 2024). Datos globales sobre atún indican que las tasas de acumulación de mercurio varían

significativamente según la especie y la región de captura, lo que confirma la influencia del origen geográfico en la carga contaminante (Nicklisch et al., 2021). Asimismo, se ha observado un aumento marcado en las concentraciones de mercurio en atún del noroeste del Pacífico, vinculado a una mayor persistencia de emisiones en esa región asiática, mientras que en otras áreas los niveles permanecen relativamente estables (Médiéu et al., 2024).

- **Procesado y almacenamiento:** Durante el procesamiento de alimentos, los metales pesados pueden incorporarse al producto final por migración desde equipos o infraestructuras de procesado si estos no están correctamente fabricados, mantenidos o regulados o bien por contacto con los envases y recipientes utilizados para contener, conservar o presentar los alimentos. Aunque actualmente existen normas estrictas que regulan los materiales en contacto con alimentos (Reglamento (CE) 1935/2004; Reglamento (CE) 2023/2006), persiste el riesgo en instalaciones antiguas o mal adaptadas. Por ejemplo, el uso de conducciones, depósitos o intercambiadores de calor fabricados en el pasado con Pb o aleaciones de Cu puede dar lugar a una migración de estos metales, especialmente en condiciones de alta temperatura, acidez o contacto prolongado. Estas vías de contaminación han sido reconocidas por organismos como la EFSA y la FDA (*Food and Drug Administration*), que han subrayado la importancia de controlar los materiales de procesado y contacto alimentario como parte de la gestión integral de riesgos químicos en la industria alimentaria. Por ejemplo, el uso de latas soldadas con Pb puede contaminar los alimentos enlatados. Un estudio reciente evaluó la migración de metales pesados como Pb y Cd desde materiales en contacto con alimentos, como envases y utensilios plásticos o metálicos, durante el procesamiento y almacenamiento. Aunque los niveles observados estaban dentro de los límites legales, el trabajo evidenció que, en condiciones de uso repetido, temperatura elevada o alimentos ácidos, puede producirse transferencia de metales al alimento. Esto subraya la importancia de controlar los materiales utilizados en la industria alimentaria, en especial en instalaciones donde no se hayan renovado los sistemas conforme a la actual normativa (Vicente et al., 2021).

Un aspecto crucial en relación con los metales pesados es su estabilidad química. A diferencia de otros contaminantes, los metales no se degradan ni se eliminan durante el procesado industrial o doméstico de los alimentos, persistiendo en el producto final con escasas variaciones en su concentración (Tchounwou et al., 2012; Jaishankar et al., 2014). Así, cuando están presentes en la materia prima (ya sea por contaminación ambiental, agrícola o durante el

almacenamiento) persisten en el producto final con escasas variaciones en su concentración. Algunos estudios, como los realizados sobre el lavado y cocción del arroz o las lentejas, han evidenciado que ciertas prácticas pueden reducir parcialmente la cantidad de metales pesados presentes en el alimento. Sin embargo, estas reducciones no son suficientes para garantizar la inocuidad del producto cuando los niveles iniciales superan los límites recomendados (EFSA, 2021). Por tanto, la prevención de la contaminación en etapas tempranas de la cadena alimentaria es la estrategia más eficaz para evitar riesgos toxicológicos.

3. Toxicidad de los metales

Algunos elementos esenciales como el Fe, Zn, Cu o Mn pueden generar efectos tóxicos cuando se encuentran en concentraciones excesivas. Aunque estos micronutrientes son necesarios para múltiples funciones biológicas una ingesta elevada puede alterar el equilibrio reducción-oxidación celular y favorecer la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN (Gaetke and Chow, 2003; O’Neal and Zheng, 2015). El exceso de hierro, por ejemplo, se ha asociado con estrés oxidativo y un mayor riesgo de enfermedades hepáticas y neurodegenerativas; mientras que la sobreexposición a cobre o manganeso puede ocasionar efectos neurotóxicos (Roohani et al., 2013; Chen et al., 2015).

Los metales pesados, sin embargo, pueden producir toxicidad a muy bajas concentraciones. Dicha toxicidad está influenciada por su forma química (WHO, 2018). El mercurio orgánico, por ejemplo, es más tóxico que el mercurio inorgánico. Este último puede transformarse en metilmercurio en el medio acuático a través de la metilación microbiana, un proceso llevado a cabo principalmente por bacterias sulfato-reductoras (*Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfobulbus propionicus*) y hierro-reductoras (*Geobacter sulfurreducens*), así como por ciertas arqueas metanogénicas (*Methanospirillum hungatei*) (Parks and Johs, 2011; Gilmour et al., 2013). Esta forma orgánica del mercurio se acumula con más facilidad en la cadena alimentaria. De manera similar, el arsénico trivalente (As III) es más tóxico que el pentavalente (As V), debido a su mayor capacidad para unirse a proteínas celulares y afectar funciones biológicas. Otro ejemplo es el cromo, el hexavalente (Cr VI) es significativamente más tóxico que el trivalente (Cr III). El Cr VI puede atravesar las membranas celulares con facilidad y generar daño oxidativo severo al ADN, aumentando el riesgo de cáncer (International Agency for Research on Cancer IARC, 2019).

La toxicidad de los metales pesados varía también según la dosis y el tiempo de exposición, generando efectos que pueden ser inmediatos o acumulativos a lo largo del tiempo (EFSA, 2012).

Los metales pesados pueden ser absorbidos por el tracto gastrointestinal, el sistema respiratorio o la piel, dependiendo de la vía de exposición (FAO/WHO, 2010). Una vez en el organismo, se distribuyen a través del torrente sanguíneo y pueden unirse a proteínas plasmáticas, facilitando su transporte a órganos diana como el hígado, los riñones, el cerebro y los huesos (Tchounwou et al., 2012). Muchos de estos metales interfieren con procesos celulares críticos, sustituyendo oligoelementos esenciales en enzimas y proteínas, alterando su función normal (Jaishankar et al., 2014). Generalmente, el cuerpo elimina estos contaminantes lentamente, aunque varía según el metal. El Cd, por ejemplo, tiene una vida media biológica de varias décadas en los riñones (Järup and Åkesson, 2009), mientras que el Hg puede eliminarse a través de la orina y las heces, pero su forma metilada tiende a bioacumularse (Clarkson and Magos, 2006; Jomova and Valko, 2011).

- **Toxicidad aguda:** Ocurre cuando hay una exposición repentina a altas concentraciones del tóxico. En el caso de la exposición a metales pesados, los síntomas de una intoxicación aguda pueden incluir náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, debilidad muscular, convulsiones y, en casos extremos, insuficiencia orgánica e incluso la muerte. Por ejemplo, la exposición aguda al Pb puede provocar encefalopatía plúmbica, mientras que la intoxicación por Hg puede desencadenar una insuficiencia renal aguda.
- **Toxicidad crónica:** Por exposiciones repetidas y prolongadas a dosis bajas, los metales pesados pueden acumularse gradualmente en órganos específicos como el sistema nervioso central, los riñones o el hígado. El Cd tiende a almacenarse en los riñones, pudiendo inducir insuficiencia renal crónica, mientras que el As se ha vinculado a varios tipos de cáncer, como los de piel y pulmón. Además, se ha observado que el Pb afecta especialmente al desarrollo neurológico en niños, contribuyendo a déficits cognitivos y alteraciones del comportamiento.

Los efectos que tienen estos elementos en el cuerpo son muy variables:

- **Mercurio:** Afecta el sistema nervioso central, provocando alteraciones cognitivas y motoras. Clasificado como posiblemente carcinogénico para humanos (Grupo 2B) (IARC, 1993).

- **Cadmio:** Se acumula en el hígado y los riñones, causando nefrotoxicidad y está clasificado como carcinógeno humano (Grupo 1) (IARC, 2012).
- **Plomo:** Provoca daño neurológico, especialmente en niños, y afecta el sistema cardiovascular. Clasificado como probablemente carcinogénico para humanos (Grupo 2A), (IARC, 2006).
- **Arsénico:** Clasificado como carcinógeno humano (Grupo 1), asociado con un mayor riesgo de cáncer de piel, vejiga, pulmón y otros órganos (IARC, 2012).

4. Exposición dietética a metales pesados

Para evaluar el riesgo de exposición a contaminantes químicos como los metales pesados, se utilizan valores de referencia toxicológicos derivados de estudios experimentales que analizan efectos adversos en animales de laboratorio o en estudios epidemiológicos. Estos valores permiten estimar el nivel de exposición que puede considerarse seguro para la salud humana en un periodo de tiempo dado.

Asimismo, en la evaluación del riesgo de exposición a sustancias químicas, se emplea habitualmente el cociente de peligro o *hazard quotient* (HQ), que se calcula comparando la exposición estimada a una sustancia con su ingesta tolerable o valor de referencia toxicológica. Cuando el HQ es superior a 1, implica que la exposición podría estar por encima del nivel considerado seguro. Asimismo, cuando se evalúan de manera conjunta distintos contaminantes con un mismo mecanismo de toxicidad, se utiliza el *hazard index* (HI), definido como la suma de los HQs individuales. Un valor de HI superior a 1 sugiere la necesidad de establecer medidas de control o prevención (Tello et al., 2023).

Con respecto a los valores de referencia toxicológicos establecidos para los metales, en el caso del Hg y el Cd, la EFSA ha establecido niveles de ingesta semanal tolerable (IST), que representan la cantidad de sustancia que puede ingerirse semanalmente a lo largo de la vida sin un riesgo apreciable para la salud. Concretamente, se ha fijado una IST de 1.3 µg/kg de peso corporal para el metilmercurio, de 4 µg/kg para el mercurio inorgánico, y de 2.5 µg/kg de peso corporal para el Cd (EFSA, 2012; EFSA CONTAM Panel, 2012). La superación de estos valores se asocia principalmente con efectos neurotóxicos en el caso del mercurio (EFSA, 2012) y daño renal en el caso del cadmio (EFSA CONTAM Panel, 2012), lo que pone de manifiesto la importancia de controlar la exposición dietética a estos elementos.

En referencia al Pb, debido a su toxicidad acumulativa y su especial impacto en la población infantil, la EFSA (2010) concluyó que no era posible establecer una ingesta diaria tolerable sin riesgo. En su lugar, recomendó utilizar un enfoque basado en el cálculo del margen de exposición (MOE) que compara la exposición estimada en humanos al Pb con niveles de referencia toxicológicos para efectos específicos, como el impacto sobre el coeficiente intelectual en niños o la presión arterial en adultos. Un MOE bajo indica un mayor nivel de preocupación sanitaria, lo que, en el caso del Pb, llevó a considerarlo una amenaza importante para la salud infantil en Europa (EFSA, 2010).

Para el As inorgánico, la EFSA también recomienda evaluar el riesgo mediante el cálculo del margen de exposición (MOE), que compara la exposición estimada en humanos con la dosis Benchmark asociada a un incremento del 0.5 % en la incidencia de cáncer (BMDL_{0.5}), establecida en 0.06 µg/kg de peso corporal por día para el As inorgánico. Un MOE bajo refleja que la exposición al arsénico inorgánico puede representar un riesgo potencial para la salud pública, lo que justifica la aplicación de medidas de gestión destinadas a reducir la exposición poblacional (EFSA CONTAM Panel, 2024).

Estudios de dieta total han permitido estimar la exposición de la población a metales pesados a través de los alimentos consumidos, proporcionando una visión más amplia de los hábitos alimentarios, diferencias entre países y cambios en el tiempo. Por ejemplo, los informes de vigilancia alimentaria de la EFSA y proyectos como el TDS-*Exposure (Total Diet Study)* en Europa han mostrado variaciones significativas en los niveles de exposición al Cd, Pb, Hg y As entre distintas regiones y subgrupos de población (EFSA, 2012; EFSA, 2020). La EFSA concluyó en su opinión científica de 2021 sobre el Cd que los niveles de exposición dietética en ciertos grupos poblacionales, incluidos niños, exceden la ingesta semanal tolerable en escenarios de consumo alto de chocolate o productos derivados del cacao (EFSA, 2021).

Asimismo, se han desarrollado estudios de evaluación de la exposición a contaminantes centrados en productos específicos, como el estudio de Jackson et al. (2024) sobre la exposición a Pb y Cd por consumo de chocolate, en el que se observó que el 43 % de las muestras analizadas superaban los niveles de plomo y el 35 % los de cadmio según la normativa de California, aunque no necesariamente frente a los valores toxicológicos europeos.

De forma complementaria, el análisis de Müller et al. (2023) sobre cacao en Europa demostró que el 58% de las muestras superaban los límites de Cd establecidos por la Unión Europea,

concluyendo que un consumo diario de 50 g de chocolate con altos niveles de este metal podría cubrir hasta el 45 % de la ingesta semanal tolerable en adultos y hasta el 85 % en niños. Estos resultados evidencian que los productos de alto consumo como el cacao pueden contribuir de forma crítica a la superación de los valores de referencia toxicológicos establecidos.

En paralelo, la evaluación de la ingesta de Hg a través de los productos de la pesca llevada a cabo por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, 2022) identificó especies como el pez espada y algunos moluscos como fuentes relevantes de exposición, mientras que otras, como la dorada, presentaban niveles mucho más bajos. Este tipo de estudios pone de relieve que la selección de especies marinas en la dieta condiciona de manera decisiva la exposición real de los consumidores al metilmercurio.

La Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (ACSA) señaló en su V Estudio de Dieta Total en Cataluña de 2019 que los moluscos bivalvos, como mejillones y almejas, pueden presentar concentraciones cercanas o superiores a los límites legales de cadmio y plomo, especialmente en muestras procedentes de áreas costeras contaminadas (ACSA, 2019).

5. Importancia del cacao y el chocolate

El cacao (*Theobroma cacao*) es un cultivo de gran relevancia económica, social y cultural. Antes de su llegada al mercado, el cacao atraviesa un proceso complejo: tras la cosecha, las vainas se abren para extraer los granos, que se fermentan durante varios días para desarrollar su sabor característico. Posteriormente, los granos se secan, se tuestan y se muelen, dando lugar a la pasta de cacao, que se separa en manteca de cacao y cacao en polvo. Este proceso puede influir en la distribución de contaminantes desde el grano hasta el producto final.

El cacao, además de ser la base de una de las industrias alimentarias más importantes a nivel global, ha mantenido una producción considerable durante las últimas dos décadas. África Occidental concentra más del 60 % de la producción mundial, siendo Costa de Marfil y Ghana los principales países productores (ICCO, 2023). Estos granos, una vez cosechados, son exportados principalmente a Europa, donde son transformados en productos derivados. Países como Bélgica, Alemania y los Países Bajos importan grandes volúmenes de cacao crudo para su procesamiento. El hecho de que el cacao se cultive en regiones tropicales influye directamente en su perfil de contaminación. Las características del suelo, el clima y las prácticas agrícolas del lugar de origen determinan en gran medida la presencia de ciertos

contaminantes en los granos, por lo que conocer la procedencia del cacao es fundamental para comprender los riesgos asociados a su consumo.

La producción de cacao ha mostrado una tendencia al alza en los últimos 20 años. Sin embargo, en 2023/2024, la producción global fue de aproximadamente 4.449.000 toneladas, lo que representa una disminución del 9,9 % respecto a las 4.938.000 toneladas registradas en la campaña anterior, según la Organización Internacional del Cacao (Statista, 2024; ICCO, citado en Agraria.pe, 2023). Factores como condiciones climáticas adversas, enfermedades de las plantas y políticas gubernamentales son los principales responsables de esta disminución (ICCO, WSJ).

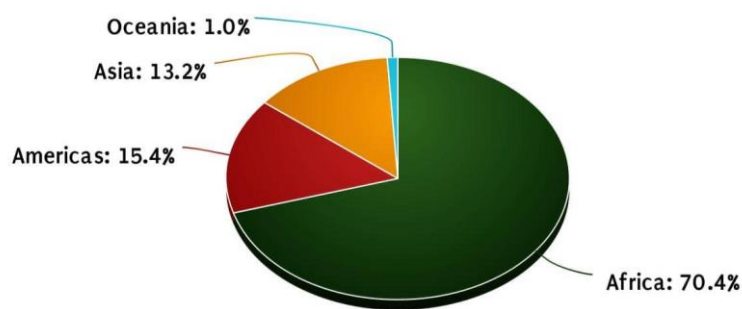


Gráfico 2. Producción de cacao por continente. Datos de FAO (FAOSTAT). Fuente: Our World in Data (2023)

El chocolate, derivado principal del cacao, es un alimento ampliamente consumido en todo el mundo. Europa lidera el consumo global, con países como Alemania, Bélgica, Suiza o Reino Unido alcanzando un consumo per cápita superior a los 9 kilogramos anuales (Statista, 2016). En España, el consumo medio de chocolate se sitúa en torno a los 2 kilogramos por persona al año. Alemania registró un consumo de 11 kg per cápita y Bélgica de 10.9 kg (*Syndicat du Chocolat*, 2016). La creciente popularidad del chocolate hace que la garantía de inocuidad del cacao y sus derivados sea una prioridad para la industria. Los datos de contaminación de estos productos, constituyen a su vez la base para un posterior análisis de exposición a contaminantes presentes en el cacao.

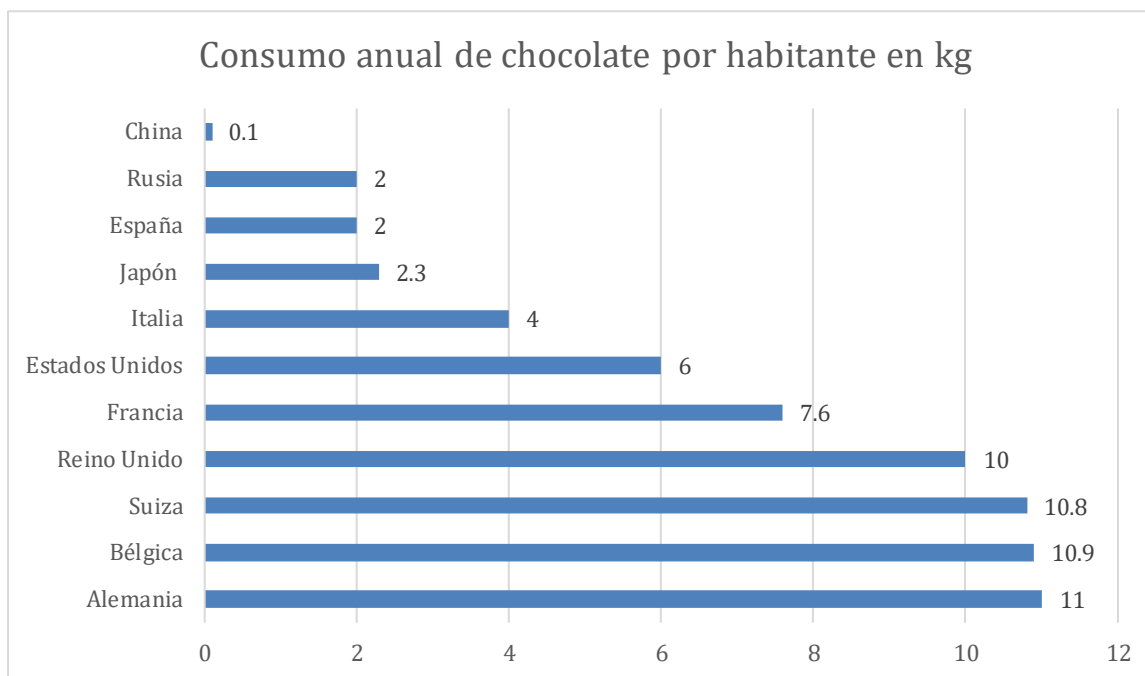


Gráfico 3. Consumo de chocolate en el mundo (kg/habitante) (Fuente; Syndicat du Chocolat, 2016)

6. Contaminación del cacao por metales pesados

El cacao es un alimento altamente susceptible a la contaminación por metales pesados debido a su capacidad para absorber estos elementos del suelo durante su cultivo. Cd, Pb, Hg y As ingresan a las plantas principalmente a través del suelo y del agua. Este fenómeno depende de diversos factores ambientales, entre los que destacan:

- **pH del suelo:** Los suelos ácidos favorecen la solubilidad de los metales pesados, aumentando su disponibilidad para las raíces del cacao. En regiones con suelos ácidos, como muchas zonas de América Latina, la disponibilidad de Cd es significativamente mayor, aumentando la probabilidad de que este metal sea absorbido y acumulado en los granos de cacao (Arevalo-Gardini et al., 2019).
- **Composición mineral:** Suelos ricos en minerales específicos pueden contener niveles elevados de Cd y Pb de origen natural.
- **Prácticas agrícolas:** El uso de fertilizantes y pesticidas, algunos de los cuales contienen trazas de metales pesados, puede agravar la contaminación.

Asimismo, durante el desarrollo de la planta, los metales pesados pueden distribuirse diferencialmente dentro de las estructuras del cacao. Por ejemplo:

- **En las raíces:** Los metales se acumulan inicialmente, actuando como un filtro parcial. Sin embargo, concentraciones elevadas pueden superar este límite y migrar hacia otras partes de la planta.
- **En las hojas y las vainas:** Aunque las hojas pueden retener una parte de los contaminantes, los metales como el Cd suelen concentrarse más en las vainas de cacao.
- **En los granos de cacao:** Durante el desarrollo y maduración de los granos, los metales pesados pueden trasladarse y acumularse en las almendras internas del cacao, que son la materia prima principal para la producción de chocolate.

El procesamiento del cacao agrava esta problemática. Durante la fermentación, el descenso del pH y la producción de ácidos orgánicos pueden promover la migración de los metales desde la cáscara hacia la parte comestible. Además, la eliminación de la testa durante la molienda no siempre elimina por completo la presencia de metales, lo que puede conducir a su acumulación en productos derivados como el chocolate negro y el cacao en polvo (Yanus et al., 2020).

Debido a su repercusión en la salud humana, la presencia de metales pesados en productos derivados del cacao es motivo de preocupación.

En un estudio realizado en Perú, Arévalo-Gardini et al. (2017) analizaron la presencia de metales pesados en hojas y granos de cacao, detectando niveles elevados de Cd en muestras de Amazonas, Piura y Tumbes, lo que generó preocupación en la industria exportadora. Aunque el Pb y el cromo se encontraron en bajas concentraciones, su acumulación varió según el tipo de suelo. El níquel (Ni) mostró una mayor presencia en hojas que en granos, indicando una limitada transferencia a la parte comestible. Por su parte, Cu, Zn y Fe estuvieron presentes en niveles adecuados para la planta y sin riesgo para la salud humana, mientras que Mn, aunque detectado en niveles altos en algunos casos, se mantuvo dentro de los límites permitidos para el consumo.

A nivel global, Consumer Reports (2024) reveló que un tercio de los productos de chocolate analizados presentaba niveles preocupantes de Cd y Pb, siendo los chocolates oscuros los más contaminados. Estos estudios muestran la variabilidad de la contaminación por Cd en cacao según la región, el año y los métodos de procesamiento, resaltando la necesidad de regulaciones y estrategias de mitigación efectivas.

De las 39 notificaciones relacionadas con el cacao y sus derivados registradas desde 2020 en el sistema RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*), 9 correspondieron específicamente a la presencia de Cd en los productos. El RASFF es un sistema de alerta rápida de la Unión Europea que permite compartir de forma eficiente información entre los Estados miembros sobre riesgos detectados en alimentos y piensos, garantizando una respuesta rápida para proteger la salud pública. Este dato pone de manifiesto la importancia del Cd como contaminante prioritario en este tipo de alimentos y subraya la necesidad de un control riguroso en toda la cadena de suministro, desde el origen agrícola hasta el producto final.

En la mayoría de los casos, las notificaciones provinieron de países europeos que importan cacao o productos intermedios de países latinoamericanos o africanos. Esto no solo señala el papel de Europa como centro transformador y consumidor de cacao, sino que también refuerza la importancia del origen geográfico como determinante del perfil de contaminación.

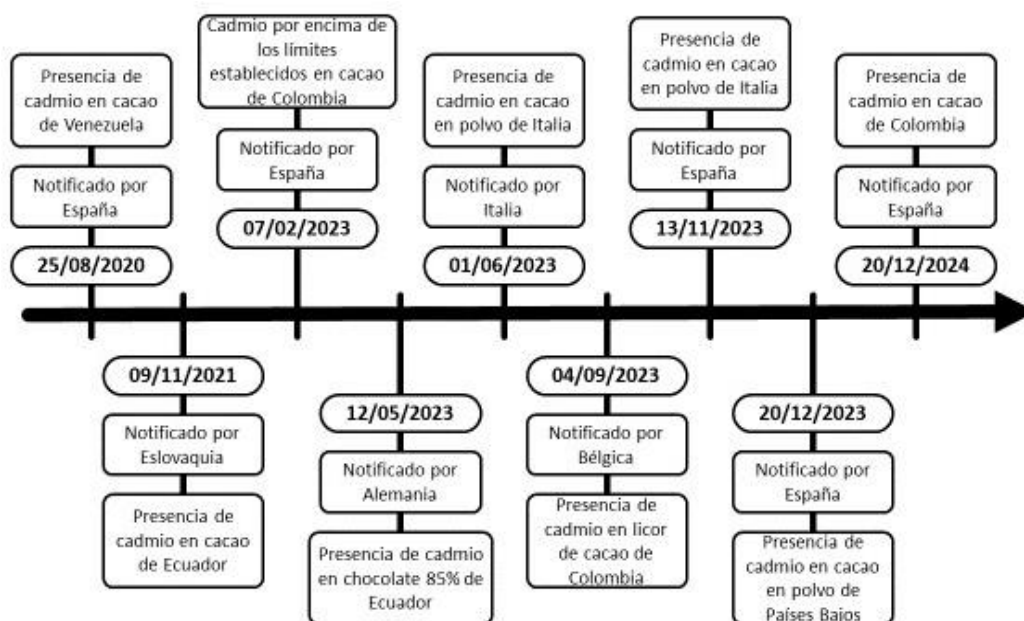


Gráfico 4. Notificaciones en el sistema RASFF por presencia de cadmio en cacao y productos derivados (2020–2024) (elaboración propia)

La contaminación por metales pesados no es un hecho anecdótico, sino una realidad recurrente que debe tenerse en cuenta al evaluar la exposición alimentaria y los riesgos para la salud pública. Además, la repetición de alertas en productos importados desde países como Colombia, Ecuador o Venezuela, notificadas a través del sistema RASFF, apunta a una problemática estructural en las condiciones de cultivo y en la composición de los suelos de esas regiones. Estas notificaciones, detectadas en el control de alimentos a su entrada al mercado

europeo, reflejan riesgos identificados durante los controles oficiales sobre productos procedentes del comercio internacional.

7. Prevención y control de la contaminación por metales pesados del cacao y sus productos derivados

La prevención de la contaminación por metales pesados en el cacao debe abordarse, en primer lugar, mediante la reducción de la contaminación ambiental general. Esto incluye controlar las emisiones industriales, promover el uso de fertilizantes y pesticidas libres de metales pesados, y fomentar buenas prácticas agrícolas en las zonas productoras. Asimismo, la gestión sostenible del suelo, la rotación de cultivos y la selección de parcelas con menor carga contaminante son herramientas clave para minimizar la absorción de metales por las plantas de cacao (Arévalo-Gardini et al., 2017 Chavez et al., 2015).

Asimismo, es fundamental contar con un sistema de control eficaz que garantice la eficacia de las medidas preventivas y que los alimentos que se comercializan no superen los límites máximos (LMs) establecidos por la legislación. Hasta la fecha, solo se han establecido límites máximos específicos de metales pesados en el cacao y sus derivados para el Cd, tal como recoge el Reglamento (UE) 2023/915. Esta regulación establece límites diferenciados en función del contenido de cacao en el producto, con el objetivo de reducir la exposición dietética de la población al Cd, dado su carácter tóxico y su presencia habitual en esta materia prima:

- Chocolate con un contenido de cacao total $\geq 50\%$: 0.8 mg/kg.
- Chocolate con un contenido de cacao total $< 50\%$ pero $\geq 30\%$: 0.3 mg/kg.
- Chocolate con un contenido de cacao total $< 30\%$: 0.1 mg/kg.
- Cacao en polvo vendido al consumidor final: 0.6 mg/kg.

Este control no solo permite retirar del mercado productos que excedan los límites legales, sino que también ayuda a evaluar el grado de exposición del consumidor a través de estos productos y a comprobar si las estrategias preventivas están siendo eficaces para reducir los niveles de metales pesados en los alimentos.

Para llevar a cabo dicho control es indispensable disponer de técnicas analíticas sensibles, específicas y robustas. Entre las más utilizadas se encuentran la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y la espectrometría de absorción atómica (AAS),

ambas recomendadas por organismos de seguridad alimentaria debido a su precisión y fiabilidad en matrices complejas como el chocolate (EFSA, 2012; Codex Alimentarius, 2014).

8. Métodos de análisis de metales en alimentos: El papel del ICP-MS

La determinación de metales en matrices alimentarias resulta difícil debido a la baja concentración en la que suelen encontrarse estos elementos y a la complejidad de las matrices que los contienen. La presencia de proteínas, grasas, azúcares y otros compuestos orgánicos puede interferir en el proceso de detección, dificultando tanto la cuantificación como la identificación precisa de los metales. Por ello, es imprescindible aplicar métodos sensibles, selectivos y capaces de manejar interferencias complejas.

Entre las técnicas habitualmente empleadas para este tipo de análisis destacan la espectroscopía de absorción atómica (AAS), la espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y, especialmente, la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), que combina una alta sensibilidad con la capacidad de análisis multielemental en tiempos reducidos y que ha demostrado ser una de las más eficaces. La capacidad de esta última técnica para detectar concentraciones en el rango de partes por billón (ppb) e incluso partes por trillón (ppt), junto con su habilidad para realizar análisis multielementales, la convierten en una herramienta fundamental en el control de calidad de los alimentos.

El ICP-MS es una técnica analítica basada en la ionización de los elementos presentes en la muestra mediante un plasma de argón a temperaturas extremadamente altas. Este proceso permite que los átomos sean convertidos en iones que se dirigen hacia un analizador de masas, donde son separados según su relación masa-carga (m/z). Finalmente, la intensidad de los iones que llega al sistema de detección permite determinar la concentración de cada elemento presente en la muestra.

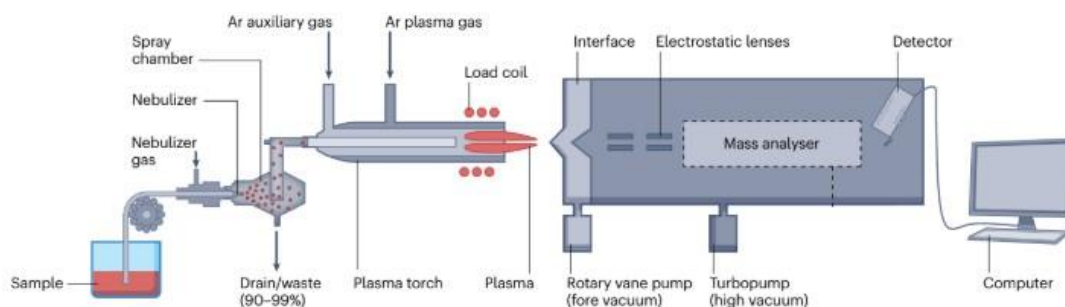


Figura 1. Esquema ICP-MS. Fuente: Van Acker et al. (2023),

El ICP-MS ha sido ampliamente utilizado en el análisis de alimentos debido a su alta sensibilidad y selectividad. Sin embargo, dado que el equipo está diseñado principalmente para el análisis de muestras líquidas, su aplicación en muestras sólidas complejas como el chocolate requiere un tratamiento previo, siendo la digestión ácida la técnica más empleada para este propósito. Esta técnica, permite convertir la muestra sólida en una solución homogénea y libre de partículas sólidas que puedan obstruir el sistema de nebulización del ICP-MS.

A pesar de su alta sensibilidad, el ICP-MS presenta ciertos inconvenientes. Las interferencias espectrales y de matriz pueden comprometer la fiabilidad de los resultados si no se manejan correctamente. Entre las interferencias más comunes en el análisis de metales pesados en chocolate, se encuentran:

- **Interferencias poliatómicas:** Se generan cuando átomos del plasma, disolventes o de la propia matriz alimentaria reaccionan entre sí, formando especies de la misma m/z que el analito de interés. Un ejemplo es la interferencia del ion $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ en la detección de hierro ($^{56}\text{Fe}^+$).

Para mitigar estas interferencias, los equipos ICP-MS modernos están equipados con celdas de colisión/reacción, en las que se pueden introducir distintos gases para eliminar las interferencias que afectan a los analitos de interés. Gases como helio (He) o hidrógeno (H_2) se suelen utilizar en modo colisión para eliminar las interferencias poliatómicas. Por otro lado, gases como el amoníaco (NH_3) o el oxígeno (O_2) se utilizan en modo reacción para detectar los analitos de interés libres de interferencias. Si dichas interferencias son las que reaccionan con el gas, el analito se detecta en su m/z original (método *on-mass*), o si, por el contrario, es el propio analito el que reacciona con el gas, el analito se detecta en la m/z correspondiente al nuevo producto generado (método *mass-shift*). Este método sirve tanto para interferencias poliatómicas como isobáricas.

- **Interferencias isobáricas:** Ocurren cuando dos elementos diferentes tienen la misma relación m/z , lo que dificulta su discriminación en el espectrómetro de masas (por ejemplo $^{87}\text{Rb}^+$ y $^{87}\text{Sr}^+$). Mediante el uso de gases de reacción en equipos con espectrómetro de masas de cuadrupolo es posible eliminar la mayoría de estas interferencias (ver arriba). Sin embargo, en los equipos con espectrómetro de masas de sector magnético es más complicado o incluso imposible eliminarlas.

- **Efectos de matriz:** En alimentos como el chocolate, la presencia de lípidos y otros compuestos orgánicos puede afectar la eficiencia de ionización de los analitos, impidiendo que su cuantificación sea exacta y precisa. Para evitarlo, se pueden utilizar distintas estrategias que minimizan el efecto de la matriz, como puede ser el uso de estándares internos cuando se utiliza una calibración externa para cuantificar, o la utilización de una adición estándar como estrategia de calibración.

Numerosos estudios han validado la aplicación del ICP-MS para la cuantificación de metales en cacao y chocolate con gran sensibilidad y precisión, siempre y cuando, el tratamiento previo que se haga a las muestras sea el adecuado para este tipo de matrices (Lo Dico et al., 2018; Rodríguez Giraldo et al., 2019; Mohamed et al., 2020; Blommaert et al., 2020; Rodríguez Giraldo et al., 2022).

OBJETIVOS DEL TRABAJO

El presente trabajo tiene como objetivo principal cuantificar y evaluar los niveles de metales manganeso (Mn), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) en diferentes tipos de muestras comerciales de chocolate.

Para ello se proponen los siguientes objetivos parciales:

- Poner a punto un método de análisis de metales en muestras de chocolate mediante una metodología basada en la digestión ácida de la muestra y la identificación y cuantificación de los analitos por la técnica ICP-MS.
- Validar el método analítico desarrollado teniendo en cuenta las recomendaciones y directrices generales relativas al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
- Evaluar la presencia de metales en distintas muestras de chocolate comercializadas en España y analizar su grado de contaminación mediante la comparación con otros estudios realizados a nivel nacional e internacional y con los límites de seguridad establecidos para los alimentos en la Unión Europea.
- Evaluar el riesgo asociado al consumo de estos productos considerando los límites establecidos por los organismos internacionales. Este análisis contribuirá a identificar riesgos potenciales para la salud pública y proporcionar información de interés para la mejora de los procesos productivos y regulatorios.

MATERIAL Y MÉTODOS

El procedimiento analítico consistió en la digestión ácida de las muestras, seguida de la determinación y cuantificación de varios analitos mediante la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), utilizando el equipo PerkinElmer NexION 300X. Esta metodología permite la detección exacta y precisa de varios analitos a niveles traza en las muestras digeridas (Van Acker et al., 2023).

1. Muestreo y tratamiento previo al ensayo

Se analizaron 30 muestras comerciales de tabletas de chocolate con distintos porcentajes (70–99 %) de cacao, adquiridas en diversos establecimientos del territorio nacional. Las muestras fueron trasladadas a la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, donde se trituraron en un molino M20 (IKA Labortechnik, Alemania) hasta obtener una textura homogénea. Una vez homogenizadas y codificadas individualmente, las muestras se almacenaron en envases de polipropileno con cierre hermético (Labbox Labware, España), hasta su análisis, en un ambiente seco y protegido de la luz solar. Una fracción de cada muestra fue enviada al laboratorio de Métodos de Análisis Rápidos con Técnicas Espectroscópicas (MARTE) de la Facultad de Ciencias de Zaragoza para su tratamiento y posterior análisis.

2. Preparación del material y de los estándares de calibración

Antes de la preparación y análisis de las muestras, se realizó un protocolo de limpieza de los vasos de precipitados empleados en la digestión (Teflon Savillex® *beakers*), con el objetivo de minimizar posibles contaminaciones. En primer lugar, los recipientes se lavaron con agua y jabón, aclarando posteriormente tres veces con agua Milli-Q. A continuación, se secaron en una placa calefactora a 80 °C durante 24 horas.

Una vez secos, se añadieron aproximadamente 5 mL de una disolución de ácido clorhídrico fumante 6 M (Merck KGaA®, 37 %), manteniéndose los *beakers* en reflujo durante otras 24 horas a 80 °C. Tras este periodo, se aclararon nuevamente tres veces con agua Milli-Q y se añadieron 5 mL de ácido nítrico 7 M (*NORMATOM*®, 67 – 69 %), repitiendo el mismo tratamiento térmico durante 24 horas. El material se mantuvo libre de potencial contaminación hasta el momento de la digestión de las muestras.

Para la preparación de los estándares de calibración externa, se siguió el siguiente protocolo:

1. Preparación de la primera disolución multielemental que contiene los analitos de interés a partir de estándares monoelementales de 1000 mg L^{-1} (Merck):

- 50 μL de Cd y Pb.
- 100 μL de As, Hg, Zn, Cu y Mn.
- 250 μL de Fe.
- Se lleva a 10 mL en HNO_3 0.7 M.

2. Segunda disolución multielemental:

- Se toman 100 μL de la primera disolución y se llevan a 10 mL en tubos falcon de 15 mL con HNO_3 0.14 M.

Se realizó además una estandarización interna con diferentes estándares (Ga, Rh, Tl e In), elegidos por su proximidad a los analitos de interés en cuanto a masa atómica.

3. Preparación de las disoluciones de estándares internos (IS):

- Se añaden 100 μL de Ga, Rh, In y Tl a 10 mL de HNO_3 0.7 M.
- Se toman 100 μL de la disolución anterior y se llevan a 10 mL en HNO_3 0.14 M.

4. Obtención de los patrones de calibración:

- Se prepara un volumen final de cada patrón de 10 mL, añadiendo 250 μL de la segunda dilución de estándar interno y distintos volúmenes de la segunda disolución multielemental, quedando 5 patrones de calibración con las siguientes concentraciones de analito:
 - ❖ Cd y Pb: 0, 0.5, 1, 2.5 y 5 $\mu\text{g L}^{-1}$.
 - ❖ As, Hg, Zn, Cu y Mn: 0, 1, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.
 - ❖ Fe: 0, 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

El primer patrón de la curva de calibrado ($0 \mu\text{g L}^{-1}$) no contiene los analitos, pero sí el estándar interno en la misma concentración que en todos los patrones y el disolvente (HNO_3 0.14 M). Esta disolución es el blanco instrumental.

3. Digestión

La digestión de la muestra es fundamental para garantizar su completa mineralización y disolución, así como para minimizar las posibles interferencias derivadas de la matriz del chocolate, las cuales podrían afectar a la exactitud y precisión del análisis.

La optimización de la digestión, se basó sobre todo en la cantidad de masa a pesar de cada muestra y de los tiempos requeridos para obtener una muestra perfectamente digerida. La

mezcla de reactivos (HNO_3 y H_2O_2) es la que más comúnmente se utiliza en digestiones de materia orgánica. Esto se debe a que tiene que ser una mezcla oxidante. Dado que las muestras a analizar tienen una matriz importante, la digestión tuvo que llevarse a cabo en varios días, realizando una pre-digestión de la misma para evitar sobrepresión en los *beakers*, que puede hacer que parte de la muestra pueda perderse al abrirlos. Finalmente, el procedimiento elegido se describe a continuación.

Aproximadamente 0.4 g de cada muestra fueron pesados en una balanza analítica de precisión (Sartorius® TE214S) y transferidos a los vasos de precipitados (Teflon Savillex® *beakers*). Posteriormente, se añadió ácido nítrico ultrapuro 14 M (NORMATOM®, 67 – 69 %). La mezcla se dejó en la campana de gases a temperatura ambiente durante la noche para favorecer una pre-digestión inicial.

Posteriormente se añadió peróxido de hidrógeno 9.8 M (H_2O_2 , Suprapur®, 30 %) en una proporción $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ de 3:1, manteniendo varias horas (6-7 horas) a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, los *beakers* fueron sometidos a calentamiento incrementando gradualmente la temperatura desde 90°C hasta alcanzar 110°C , manteniéndola durante la noche (aproximadamente 16 horas) hasta la obtención de una disolución homogénea.

Finalizado el proceso de digestión, las disoluciones se enrasaron con agua Milli-Q en matraces aforados de 25 mL y se almacenaron adecuadamente hasta su análisis por ICP-MS.

4. Preparación de las disoluciones de medida de las muestras

A partir de las muestras digeridas y diluidas en matraces aforados de 25 mL, se prepararon distintas diluciones, destinadas a su posterior análisis instrumental mediante ICP-MS. Se prepararon dos tipos de dilución dependiendo de la concentración de analitos esperada en las muestras, en base los valores reportados para el material de referencia:

- Dilución 1:43: se transfirieron 7 mL de la muestra a un tubo Falcon de 15 mL, a los que se añadieron 250 μL de la disolución de estándar interno y 2.75 mL de agua MilliQ, obteniéndose un volumen final de 10 mL. Con esta dilución se cuantificó As, Cd, Hg y Pb.
- Dilución 1:111: se mezclaron 90 μL de muestra con 250 μL de patrón interno y 9.66 mL de ácido nítrico 0.14 M, completando también un volumen de 10 mL. Con esta dilución se

cuantificó Mn, Fe, Cu y Zn. A continuación, se muestra el esquema de preparación de disoluciones de medida (Grafico 5).

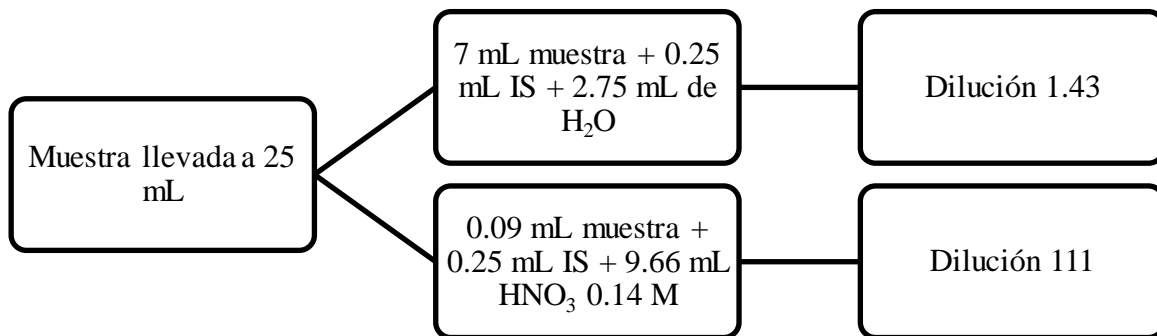


Gráfico 5. Esquema preparación de las diluciones

5. Determinación de metales por ICP-MS

5. 1. Isótopos seleccionados para la determinación

Los analitos de interés se seleccionaron en base a su carácter representativo desde el punto de vista nutricional y toxicológico en el chocolate. En general, se midieron los isótopos más abundantes de cada analito (siempre que no tenga interferencias espectrales). De los analitos de interés, los que están afectados por interferencias espectrales son Fe y As. En el caso del Fe, el isótopo más abundante es el $^{56}\text{Fe}^+$ (%) que tiene una importante interferencia con $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$. Para el As (monoisotópico $^{75}\text{As}^+$), la interferencia que puede afectar a su cuantificación es $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. Mediante la medida de los materiales de referencia certificados se evaluó la necesidad de la utilización de gases de colisión/reacción para eliminar las posibles interferencias que pudiesen afectar a la cuantificación de los analitos. Para evaluar la necesidad de la utilización o no de gas de colisión/reacción, se realizaron medidas utilizando He en la celda de colisión/reacción midiendo $^{56}\text{Fe}^+$ y $^{75}\text{As}^+$. Posteriormente, se realizaron medidas sin gas de $^{57}\text{Fe}^+$ (isotopo de Fe menos afectado por interferencias espectrales, pero menos abundante) y $^{75}\text{As}^+$. Tras la comparación de los resultados obtenidos mediante ambos métodos (con o sin gas), no se observaron diferencias entre ambos, por lo que se decidió utilizar el método sin gas. Los parámetros de adquisición de datos finales utilizados en este estudio fueron los siguientes:

Tabla 1. Parámetros del método de análisis

Analito	Isótopo monitorizado	Tiempo de integración (ms)	Tiempo de adquisición (s)	Réplicas
As	⁷⁵ As	10	11.2	10
Cd	¹¹¹ Cd	10	9.2	10
Hg	²⁰² Hg	10	11.2	10
Pb	²⁰⁸ Pb	10	9.2	10
Mn	⁵⁵ Mn	10	12.6	10
Fe	⁵⁷ Fe	10	12.6	10
Cu	⁶³ Cu	10	12.6	10
Zn	⁶⁶ Zn	10	12.6	10
Estándar interno	⁶⁹ Ga, ¹⁰³ Rh, ¹¹⁵ In, ²⁰⁵ Tl	10	13.3	10

5. 2. Condiciones instrumentales

El análisis de los analitos de interés en las muestras de cacao se llevó a cabo mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), utilizando el equipo PerkinElmer NexION 300X. Este instrumento está equipado con un nebulizador concéntrico de vidrio, una cámara de nebulización ciclónica y una bomba peristáltica para la introducción de la muestra. Esta se introduce en un plasma de argón de alta temperatura (ICP), donde se lleva a cabo la vaporización, atomización e ionización, previa a la introducción en un espectrómetro de masas de cuadrupolo, el cual selecciona el analito de interés en función de su relación masa/carga. Finalmente, los iones son dirigidos a un sistema de detección que consiste en un fotomultiplicador de electrones. Como gas de plasma, auxiliar y de nebulización se empleó argón de alta pureza ($\geq 99,999\%$, Air Liquide). Diariamente, se mide una disolución estándar de ajuste (NexION Setup Solution) con el fin de comprobar el correcto rendimiento del equipo y asegurar que las medidas se realizan con la máxima sensibilidad y estabilidad. Los parámetros instrumentales establecidos en el equipo fueron (Tabla 2):

Tabla 2. Parámetros instrumentales del equipo

Parámetros	Valores
Flujo de gas nebulizador	0.96 L/min
Flujo de gas auxiliar	1.2 L/min
Flujo de gas plasma	16 L/min
Potencia del plasma RF	1500 W
Voltaje de etapa analógica	-1750 V
Voltaje de etapa de pulso	1500 V
Voltaje fijo QID	-8.65 V
Desplazamiento de varilla del cuadrupolo	-12 V
Voltaje de entrada de celda	-12 V
Voltaje de salida de celda	-15 V
Desplazamiento de varilla de celda	0 V
Voltaje de campo axial	0.96 L/min

6. Validación del método

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas en los ensayos descritos en el apartado anterior, se procedió a la validación del método analítico. Para ello se siguieron las directrices de la guía EURACHEM (2020), que establece los procedimientos para la evaluación de parámetros como veracidad, precisión, incertidumbre y sensibilidad. Esta guía no define rangos específicos de aceptación para los parámetros evaluados, por lo que en este trabajo se adoptó el intervalo de recuperación de 80 – 110 %, criterio ampliamente empleado en la literatura científica y en guías internacionales como la de la AOAC (2016) para métodos químicos en alimentos. Asimismo, la AOAC (2016) establece que la precisión debe evaluarse en función de la concentración del analito, admitiendo coeficientes de variación más altos a niveles próximos al LOQ y más restrictivos a concentraciones medias y altas. En cuanto a la incertidumbre, la AOAC no fija valores numéricos concretos, remitiendo a guías para su estimación y reporte. Por último, la sensibilidad se interpreta a partir de los valores de LOD y LOQ alcanzados, los cuales deben ser adecuados para garantizar la detección y cuantificación fiable del analito en la matriz de estudio.

Para ello, se empleó como material certificado de referencia (CRM) el SRM 2384 *Baking Chocolate del National Institute of Standards and Technology* (NIST, EE. UU.), considerado idóneo para matrices similares al chocolate. El uso de CRM constituye la mejor práctica en validación de métodos analíticos, ya que aporta valores certificados con alta trazabilidad metrológica. Este material consiste en chocolate de repostería elaborado a partir de granos de cacao 100 %, proveniente de un único lote de producción, y se presenta en barras de 91 g.

En la Tabla 3 se incluyen los valores certificados de concentración de los metales de interés Cd, Pb, Cu, Fe, Mn y Zn. La utilización de este CRM permitió evaluar la veracidad y precisión del método en condiciones comparables a la matriz de las muestras analizadas, garantizando que las desviaciones observadas pudieran atribuirse a las características del procedimiento y no a la falta de exactitud en el material de referencia.

Tabla 3. Valores certificados de concentración de metales en el SRM 2384 (Baking Chocolate, NIST)

	Fracción en masa (mg/kg)	
Cadmio (Cd) ^(a)	0.0734	± 0.0077
Calcio (Ca) ^(b, c)	840	± 74
Cobre (Cu) ^(b, c)	23.9	± 1.0
Hierro (Fe) ^(b, c)	132	± 11
Plomo (Pb) ^(a)	0.0357	± 0.0046
Magnesio (Mg) ^(b, c)	2610	± 120
Manganeso (Mn) ^(b, c)	20.8	± 1.3
Fósforo (P) ^(b, c)	3330	± 210
Potasio (K) ^(b, c)	8650	± 400
Zinc (Zn) ^(b, c)	37.6	± 1.9

^(a) NIST ID ICP-MS

^(b) NIST ICP-OES

^(c) Laboratorios colaboradores

- 1. Linealidad:** Se evaluó mediante curvas de calibración externa con cinco niveles de concentración. Todos los elementos presentaron coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.995.
- 2. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ):** Se calcularon a partir de la desviación estándar de los blancos de método ($n=10$), aplicando los factores 3.3 para LOD y 10 para LOQ.

$$LOD = 3.3 * \left(\frac{\sigma}{s}\right) \quad LOQ = 10 * \left(\frac{\sigma}{s}\right)$$

Donde σ es la desviación estándar del blanco de método y s la pendiente de la curva de calibración.

- 3. Exactitud:** La exactitud se evaluó considerando tanto la veracidad como la precisión del método. La veracidad se determinó mediante el análisis del material certificado de referencia, comparando las concentraciones obtenidas con los valores certificados y

calculando su porcentaje de recuperación. Para ello, se analizaron cuatro réplicas iniciales junto con un blanco de método. La precisión se calculó como la desviación estándar relativa (RSD %) de las mediciones repetidas, reflejando la precisión del procedimiento. Adicionalmente, durante cada jornada de análisis de muestras se incluyeron dos réplicas adicionales del CRM con el fin de verificar la estabilidad del método a lo largo del tiempo.

- 4. Incertidumbre instrumental:** Para determinarla se calculó la desviación estándar (s) de las 10 medidas realizadas por muestra.
- 5. Selectividad:** La selectividad del método se comprobó mediante el empleo de estándares internos, Galio (Ga), Rodio (Rh), Indio (In) y Talio (Tl), con masas atómicas próximas a las de los analitos de interés, pero sin riesgo de interferencia espectral. Esto permitió corregir posibles efectos matriz y asegurar que las señales cuantificadas correspondieran de forma específica a cada metal. Tras la evaluación de los resultados, se seleccionó el indio (In) como estándar interno de referencia.

7. Procesamiento de datos

Todo el tratamiento de datos se realizó en hojas de cálculo de Excel mediante una plantilla diseñada para el estudio, lo que permitió sistematizar los cálculos y reducir errores manuales.

La cuantificación de los analitos de interés se realizó empleando el método de calibración externa, utilizando las curvas obtenidas a partir de las disoluciones patrón. Como estándar interno, finalmente se decidió emplear In por mostrar el mejor comportamiento en cuanto a corrección de posibles derivas instrumentales y efectos de matriz.

El procedimiento de cálculo siguió varias etapas consecutivas. En primer lugar, el equipo proporcionó la señal bruta en forma de cuentas por segundo (cps) para cada isótopo monitorizado. Posteriormente, estas señales se normalizaron mediante el estándar interno, dividiendo la intensidad del analito entre la intensidad registrada para el In, corrigiendo así fluctuaciones debidas a variaciones en la introducción de muestra o a inestabilidades del plasma.

Las señales normalizadas se interpolaron en la correspondiente recta de calibración externa, obtenida a partir de los patrones multielementales, lo que permitió calcular la concentración del analito en la disolución inyectada. Para cada muestra se realizaron diez medidas

consecutivas (n = 10), empleando el valor medio como concentración representativa y reduciendo la variabilidad asociada a la medida puntual.

Finalmente, a las concentraciones obtenidas se les aplicó el factor de dilución correspondiente. En este estudio se emplearon dos condiciones: un factor de dilución de 1,43 para Mn, Fe, Cu y Zn, elementos esenciales cuya presencia en cacao se esperaba en concentraciones más elevadas, y un factor de dilución de 111 para Cd, Pb, As y Hg, metales tóxicos cuya concentración prevista era considerablemente menor. Con ello se obtuvo la concentración final de cada elemento en las muestras de cacao, expresada en $\mu\text{g L}^{-1}$, que posteriormente se transformó a mg kg^{-1} en base al peso de muestra utilizado en la digestión.

8. Estimación de la ingesta de metales por consumo de chocolate

Para evaluar la exposición a contaminantes químicos a través de la dieta se utiliza la Ingesta Diaria Estimada (IDE). La IDE, es una predicción de la ingesta diaria basada en la determinación de la concentración de un contaminante en los alimentos y en los datos más fiables disponibles sobre consumo de alimentos en relación con una población determinada.

A partir de los datos medios de contaminación de las muestras analizadas en este trabajo, se estimó la contribución del consumo de chocolate a la ingesta de metales mediante la siguiente fórmula:

$$IDE (\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}) = C * c$$

Donde C representa la concentración de metal en el alimento ($\mu\text{g}/\text{g}$) y c es el consumo diario del alimento, expresado por kg de peso corporal del individuo ($\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$).

Los datos de consumo de alimentos se obtuvieron de la base de datos ENALIA 2, correspondiente a la *Encuesta Nacional de Alimentación en la población infantil y adolescente, adulta y embarazada en España*, elaborada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Este estudio proporciona información detallada y representativa sobre los patrones de consumo alimentario de la población española, siendo una referencia fundamental en evaluaciones de riesgo dietético (AESAN, 2015).

Se tuvieron en cuenta los datos de consumo de chocolate establecidos para productos con más de un 70 % de cacao en la población adulta (18 – 74 años). Según la Encuesta Nacional de

Alimentación en la Población Adulta (ENALIA 2), el consumo medio de chocolate negro en esta población es de 0.150 g/kg pc/día, mientras que el percentil 95 (P95), que representa el consumo por debajo del cual se sitúa el 95 % de la población, alcanza los 0.293 g/kg pc/día (AESAN, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Validación del método

Tal y como se ha comentado anteriormente, la validación del método se llevó a cabo mediante la determinación de los analitos de interés en un material de referencia certificado (NIST SRM 2384, Baking Chocolate). En la siguiente tabla se presentan los valores de LOD y LOQ y de veracidad y precisión, obtenidos para la validación del método.

Tabla 4. Resultados de la validación del método

Analito	Cd	Pb	Mn	Fe	Cu	Zn
Concentración medida (mg/kg) (Recuperación (%))	0.0697 (94.9)	0.0519 (145.4)	21.8546 (105)	169.224 0 (128.2)	25.5491 (106.9)	36.4720 (97)
Precisión (%)	4.92	23.51	4.53	4.24	7.50	7.33
LOD (mg/kg)	0.002	0.002	0.245	0.892	0.008	0.046
LOQ (mg/kg)	0.0123	0.0058	0.046	0.269	0.026	0.138

En los días de análisis posteriores, los valores recuperación y precisión obtenidos para el material certificado se mantuvieron en rangos similares a los de la validación inicial.

En cuanto a la sensibilidad del método, evaluada mediante el cálculo de los LOD y LOQ, todos los analitos mostraron valores adecuados para el análisis. Las concentraciones certificadas de Cd, Pb, Mn, Fe, Cu y Zn superan ampliamente los LOQs obtenidos. Además, los valores de LOQ obtenidos son muy inferiores a los valores de contaminación esperables en muestras de chocolate, lo que confirma la capacidad del método para su correcta cuantificación en matrices similares. Asimismo, para el Cd, el LOQ alcanzado resulta muy inferior al límite máximo establecido por la legislación europea en chocolate (0.8 mg/kg para contenidos de cacao superiores al 50 %, Reglamento (UE) 2023/915). Por otro lado, la linealidad del método fue satisfactoria, con coeficientes de correlación (R^2) elevados para todos los analitos (Tabla 5).

Tabla 5. Coeficientes de correlación obtenidos para la recta de calibrado

Analito	Coefficiente de correlación (R ²)
Cd	0.9957
Pb	0.9954
Mn	0.9998
Fe	0.9989
Cu	0.9998
Zn	0.9998

El Cd, Mn, Fe, Cu y Zn presentaron porcentajes de recuperación que generalmente se encontraron dentro del rango considerado aceptable (80 % – 110 %), lo que demuestra la veracidad del método para el análisis de estos metales en muestras de chocolate. En contraste, el Pb presentó concentraciones sistemáticamente por encima del valor teórico, con valores de recuperación que llegaron a alcanzar hasta 163.4%. Este comportamiento puede estar influenciado por la capacidad contaminante del Pb y la baja concentración a la que se encuentra en el CRM, lo que puede explicar parcialmente su aparente exceso. Este comportamiento se ha descrito también en otros trabajos donde se discute la validación de la metodología ICP-MS para analizar metales en chocolate y matrices similares, en los que también se describen para el Pb recuperaciones por encima de 100 %, atribuidas a su baja masa disponible y a la facilidad de contaminación de las muestras durante el análisis (Peixoto et al., 2016; Mohamed et al., 2020). En consecuencia, los resultados de contaminación por Pb obtenidos en las muestras analizadas, deben interpretarse con mayor cautela.

La precisión para Cd, Mn, Fe, Cu y Zn osciló entre 4.24 % para Fe y 7.50 % para Cu, valores dentro del rango establecido por la AOAC (AOAC, 2016). Sin embargo, el Pb mostró desviaciones considerablemente más altas (23.51 %), lo que refuerza la necesidad de tomar precauciones al interpretar los valores obtenidos en las muestras analizadas. Este patrón coincide con lo descrito por Mohamed et al. (2020), quienes señalaron que la determinación de Pb y Zn mediante ICP-MS en matrices alimentarias suele verse afectada por bajas concentraciones, interferencias espectrales y elevada susceptibilidad a la contaminación externa.

Se observaron resultados similares en el estudio de Peixoto et al. (2016), en el que se validó la determinación de varios metales en chocolate utilizando el material certificado NIST SRM

2384. En dicho trabajo, los valores de recuperación para Fe, Cu, Mn y Zn fueron comparables a los obtenidos en este trabajo (aprox. 90 – 105 %), mientras que el Pb también mostró valores de recuperación más elevados (> 120 %). Estos hallazgos respaldan que las diferencias de comportamiento dependen del analito, especialmente cuando se trabaja con concentraciones próximas al LOQ. En vista de los resultados obtenidos en los análisis del material certificado de referencia, la validación realizada demostró la adecuación del método para cuantificar con exactitud y precisión los analitos evaluados, excepto en el caso del Pb, cuyos resultados deben interpretarse con cautela.

2. Presencia de metales en las muestras analizadas

En la siguiente tabla se presentan las concentraciones de metales halladas (mg/kg) en las muestras de chocolate analizadas. Los colores de las celdas se corresponden con las diferentes fechas de análisis de las muestras en el equipo ICP-MS: azul (Día 1), naranja (Día 2) y verde (Día 3).

Tabla 6. Resultados para las muestras analizadas (mg/kg)

Resultados obtenidos (mg/kg)	As	Cd	Hg	Pb	Mn	Fe	Cu	Zn
Muestra 1	0.0326	0.0305	0.0354	0.0213	5.4672	8.1141	10.1819	5.4964
Muestra 2	0.0415	0.0531	0.0486	0.1325	12.1539	16.9351	15.9333	16.9647
Muestra 3	0.0248	0.0602	0.0405	0.0311	2.2714	19.7408	8.0105	9.9389
Muestra 4	0.0858	0.0645	0.0845	0.1194	23.2726	23.5807	20.4415	29.9966
Muestra 5	0.0227	0.0573	0.0338	0.3582	17.6047	16.3046	25.0992	22.4269
Muestra 6	0.1242	0.1124	0.1586	0.1781	22.6713	18.7400	20.2505	32.1724
Muestra 7	0.1516	0.1045	0.1984	0.2637	23.7511	16.3475	18.7045	27.3705
Muestra 8	0.2426	0.0710	0.3483	0.3653	35.5378	17.0675	23.7328	29.8406
Muestra 9	0.0408	0.5105	0.0365	0.0268	11.1309	14.8022	6.0477	14.5411
Muestra 10	0.0184	0.1505	0.0390	0.0161	1.0657	18.6275	3.7360	14.4985
Muestra 11	0,0199	0.0531	0.0428	0.0350	4.8218	17.5529	5.7282	5.1816

Muestra 12	0.0314	0.0832	0.0911	0.0313	18.0786	18.9270	14.7656	21.7232
Muestra 13	0.0389	0.0644	0.0898	0.0690	14.0132	19.0903	13.9447	19.0111
Muestra 14	0.0173	0.0816	0.0464	0.0163	8.3459	13.8496	9.5643	11.9004
Muestra 15	0.0292	0.1683	0.0813	0.1132	10.2090	17.8014	12.4532	17.6299
Muestra 16	0.0311	0.0604	0.0478	0.0440	7.1792	18.3767	3.0194	3.9830
Muestra 17	0.0444	0.2226	0.0800	0.0453	8.6352	14.7643	9.3681	16.2948
Muestra 18	0.0188	0.2206	0.0479	0.0412	5.7068	16.3583	6.4003	15.5970
Muestra 19	0.0288	0.1066	0.0930	0.0275	12.9066	18.0885	12.9688	19.8563
Muestra 20	0.0408	0.0821	0.0785	0.0612	20.5792	16.7735	17.7552	26.6934
Muestra 21	0.0350	0.2015	0.0918	0.0555	17.1300	22.0755	1.3954	11.7570
Muestra 22	0.0415	0.0622	0.0878	0.0377	6.2003	23.5701	2.6276	16.9651
Muestra 23	0.0275	0.0895	0.0858	0.0417	16.2160	16.1167	17.2534	23.4507
Muestra 24	0.0385	0.0428	0.0871	0.0486	20.4125	14.3612	13.5011	19.6544
Muestra 25	0.0272	0.1405	0.0851	0.0480	11.8172	17.3079	15.7338	19.9779
Muestra 26	0.0188	0.2016	0.0956	0.0520	38.6161	14.3316	4.2765	67.2733
Muestra 27	0.0300	0.1372	0.0913	0.0555	8.9394	17.0269	4.6023	13.6742
Muestra 28	0.0425	0.0706	0.0962	0.0644	9.9685	15.2964	12.6416	21.5652
Muestra 29	0.0265	0.0375	0.0770	0.0691	17.6861	12.3726	27.2203	51.5714
Muestra 30	0.0163	0.2641	0.0867	0.0430	7.1465	17.9497	2.6118	23.3889

En general, los niveles de metales en las muestras analizadas presentaron una elevada variabilidad. El As osciló entre 0.0163 y 0.2426 mg/kg, mientras que el Cd se detectó en concentraciones comprendidas entre 0.0305 y 0.5105 mg/kg. El Hg y Pb mostraron valores medios muy similares (0.0904 y 0.0917 mg/kg, respectivamente). Como era de esperar, los metales esenciales como Mn, Fe, Cu y Zn se encontraron en niveles mucho más altos (entre 1.06 y 67.27 mg/kg), destacando el hierro y el zinc como los elementos mayoritarios en la matriz. El análisis de la dispersión indica que la variabilidad relativa fue especialmente marcada

en el caso de As, Cd y Pb (% RSD > 85 %), mientras que Fe presentó los valores más consistentes (19.6 %). La muestra con mayor concentración de Cd alcanzó 0.51 mg/kg, mientras que para As se registró un máximo de 0.24 mg/kg.

Tabla 7. Media, mediana y límites mínimos y máximos de los metales presentes en las muestras

	Media (mg/kg)	Mediana (mg/kg)	Mínimo (mg/kg)	Máximo (mg/kg)
As	0.0492 ± 0.05	0.0314	0.0163	0.2426
Cd	0.1165 ± 0.10	0.0816	0.0305	0.5105
Hg	0.0904 ± 0.07	0.0858	0.0038	0.3483
Pb	0.0917 ± 0.10	0.0520	0.0161	0.3653
Mn	14.5811 ± 9.33	12.1539	1.0657	28.6161
Fe	17.1156 ± 3.35	17.0675	8.1141	23.5807
Cu	12.4183 ± 7.54	12.6416	1.3954	27.2203
Zn	21.9188 ± 13.48	19.6544	5.1816	67.2733

Esta variabilidad observada entre marcas y lotes refuerza la importancia de continuar monitoreando la presencia de metales en alimentos derivados del cacao, especialmente en aquellos con altos porcentajes de materia prima.

En el presente trabajo, la media de Cd obtenida coincide con los valores descritos por Sager (2012), quien analizó tabletas de chocolate comercializadas en Austria con porcentajes variables de cacao, y determinó concentraciones entre 0.03 y 0.51 mg/kg mediante espectrometría de absorción atómica (AAS). Por su parte, Lo Dico et al. (2018) estudiaron chocolates distribuidos en Italia, también mediante AAS, obteniendo valores medios en torno a 0.116 mg/kg. Sin embargo, los datos publicados por la Comisión del Codex Alimentarius (2017) en un análisis multicéntrico realizado tanto a través de AAS como ICP-MS de 453 muestras de chocolate con un contenido de cacao superior al 70 % ponen de manifiesto que el Cd puede alcanzar concentraciones considerablemente más elevadas, con valores que oscilaron entre no detectado y 2.30 mg/kg. Este informe evidencia también la influencia del origen geográfico: mientras que en Europa las muestras se situaron en un rango más bajo (ND – 0.49 mg/kg), en América Latina y Asia se alcanzaron los niveles máximos (hasta 2.30 y 1.72 mg/kg, respectivamente). Estos resultados subrayan que, a diferencia de lo observado en estudios europeos, el Cd sigue constituyendo un riesgo relevante en chocolates de alto porcentaje de

cacao, especialmente cuando proceden de regiones latinoamericanas y asiáticas (Jackson et al., 2024).

Este problema ha sido destacado en informes recientes de la EFSA (2021), que identifican al chocolate como una de las principales fuentes de exposición dietética al Cd en la población europea, especialmente en niños, donde el consumo puede representar hasta un 40 – 50 % de la ingesta semanal tolerable. En paralelo, el sistema europeo de alertas rápidas para alimentos y piensos (RASFF) ha registrado en los últimos años notificaciones relacionadas con lotes de chocolate importado que superaba los límites máximos establecidos, con especial frecuencia en partidas procedentes de América Latina. De forma complementaria, Müller et al. (2023) demostraron que más del 50 % de las muestras de cacao analizadas en Europa contenían Cd por encima de los niveles regulados en la UE.

En relación con el As, los resultados obtenidos en este estudio se encuentran en el mismo rango que los descritos por Mohamed et al. (2020), quienes analizaron tabletas de chocolate disponibles en el mercado egipcio mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS), determinando una concentración media de 0.02 ± 0.01 mg/kg. Estos valores, similares a los observados aquí, ponen de manifiesto que la presencia de As en chocolates suele ser baja. Esto sugiere que, aunque el cacao puede acumular metaloides como el As debido a la composición del suelo y a prácticas agrícolas específicas, su transferencia al producto final es limitada en comparación con lo que ocurre en otros alimentos.

Del mismo modo, la concentración de Pb encontrada en este trabajo se encuentra en línea con la reportada por Sager (2012) en chocolates europeos (0.01 – 0.11 mg/kg) y con la descrita por Salama (2018) en muestras procedentes de Egipto (0.061 mg/kg), ambos utilizando técnicas de absorción atómica. No obstante, dado que la validación del método aplicado a este analito no resultó completamente satisfactoria, los valores obtenidos deben interpretarse con cautela.

Respecto al Mn, Yanus et al. (2014) evaluaron chocolates con alto contenido de cacao comercializados en Brasil, utilizando ICP-MS, y encontraron una media de 15.09 ± 1.41 mg/kg. En estudios posteriores, Villa et al. (2015) obtuvieron valores medios de 14 ± 0.2 mg/kg en chocolates de distintas marcas en España, empleando también ICP-MS. Los resultados aquí obtenidos se encuentran dentro de este mismo rango, lo que parece indicar que el Mn, metal esencial involucrado en funciones enzimáticas, se mantiene relativamente constante en el chocolate independientemente de la zona geográfica o marca comercial.

En el caso del Fe, la concentración media observada en este estudio (17.4 ± 3.35 mg/kg) resulta algo inferior a la señalada por Alagic et al. (2015) en chocolates oscuros de Serbia con > 65 % de cacao (38.65 ± 0.89 mg/kg), y se encuentra por debajo del rango descrito por Arévalo-Gardini et al. (2017) en granos de cacao de distintas regiones del Perú ($34.00 - 53.55$ mg/kg, analizados por ICP-OES). Esta diferencia puede deberse tanto a la variabilidad natural del cacao en función de la zona de cultivo, como al hecho de que en este trabajo se analizó el producto final (chocolate), mientras que Arévalo-Gardini et al. (2017) estudió directamente granos de cacao. Esto refuerza la idea de que el contenido mineral depende tanto de la matriz analizada como de la procedencia del cacao, y que los niveles observados en este estudio, en línea con los reportados por Arévalo-Gardini et al. (2017), sitúan al chocolate como una fuente complementaria de hierro en la dieta, sin implicar un riesgo relevante de exposición.

Finalmente, en cuanto al Hg, las concentraciones halladas en este estudio fueron mucho más bajas que las descritas en estudios centrados en granos de cacao. Por ejemplo, Bertoldi et al. (2016) reportaron concentraciones medias de $2.2 - 3.1$ mg/kg en granos de cacao de distintas regiones, con valores especialmente elevados en muestras de América Central, analizados mediante espectrometría de absorción atómica en vapor frío (CV-AAS).

En conjunto, la comparación de nuestros resultados con los distintos estudios publicados evidencia la importancia de considerar no solo las concentraciones medidas, sino también la matriz analizada (granos vs chocolate) y la técnica analítica empleada. Estos factores explican en buena medida las variaciones observadas y permiten contextualizar la presencia de metales tanto esenciales (Mn, Fe, Zn, Cu) como tóxicos (As, Cd, Pb, Hg) en el chocolate como alimento de consumo habitual.

Los elementos analizados en este estudio pueden dividirse en dos grupos:

Por un lado, metales como Fe, Mn, Cu y Zn se consideran micronutrientes esenciales para el ser humano. Estos elementos participan en procesos celulares clave, y su ingesta en cantidades adecuadas es fundamental para el mantenimiento de la salud. Sin embargo, en concentraciones elevadas pueden tener efectos adversos, aunque la probabilidad de toxicidad asociada al consumo de chocolate es baja, y por tanto no existen actualmente límites máximos legales establecidos para estos elementos en esta matriz. En consecuencia, la literatura científica sobre sus niveles en chocolate es limitada y dispersa, dificultando comparaciones sistemáticas.

Por otro lado, existen elementos tóxicos como Cd, Pb, As y Hg que sí pueden contaminar el chocolate. El Cd en particular representa una preocupación central en el ámbito de la seguridad alimentaria y ha sido ampliamente abordado en la literatura científica y en la legislación internacional. Estudios recientes han demostrado que su absorción y acumulación en el cacao no dependen únicamente de una contaminación superficial, sino de un proceso multifactorial. El cacao muestra una elevada eficiencia en la absorción de Cd del suelo, incluso cuando las concentraciones ambientales son bajas, gracias a su sistema radicular fino que facilita la captación de Cd intercambiable, especialmente en suelos ácidos o con baja materia orgánica (Bertoldi et al., 2016).

Una vez absorbido, el Cd se acumula principalmente en la testa del grano, aunque diversos estudios han confirmado su migración parcial al grano durante la fermentación y procesado. Vanderscheuren et al. (2022) demostraron que este proceso no puede evitarse por completo, lo que explica la presencia de Cd incluso tras aplicar medidas de descascarillado. Además, la fracción química en la que se encuentra condiciona tanto su biodisponibilidad intestinal como su persistencia en el chocolate final, aspectos que requieren mayor investigación (Vanderscheuren et al., 2022; Bloomaert et al., 2024). En este trabajo, resulta difícil vincular la contaminación a un origen geográfico concreto, ya que, salvo excepciones, el etiquetado no indica la procedencia de la materia prima.

Tabla 7. Valores medios, mínimos y máximos en mg/kg de las muestras agrupadas por porcentaje de cacao

		As	Cd	Hg	Pb	Mn	Fe	Cu	Zn
70-74.99% de cacao	Media (mg/kg)	0.0415	0.0531	0.0486	0.1325	12.154	16.9351	15.9333	16.9647
	Mínimo- máximo	0.0227- 0.0858	0.0305- 0.0645	0.0338- 0.0845	0.0213- 0.3582	2.2714- 23.2726	8.1141- 23.5807	8.0105- 25.0992	5.4964- 29.9966
75-79.99% de cacao	Media (mg/kg)	0.1155	0.1898	0.1562	0.17	18.8314	17.1169	14.4943	23.6846
	Mínimo- máximo	0.0184- 0.2426	0.071- 0.5105	0.0365- 0.3483	0.0161- 0.3653	1.0657- 35.5378	14.0822- 18.74	3.736- 23.7928	14.4985- 32.1724
80-84.99% de cacao	Media (mg/kg)	0.0273	0.0901	0.0703	0.053	11.0937	17.4442	11.2912	15.0892
	Mínimo- máximo	0.0173- 0.0389	0.0531- 0.1683	0.0428- 0.0911	0.0163- 0.1132	4.8218- 18.0786	13.8496- 19.0903	5.7282- 14.7656	5.1816- 21.7232
85-89.99% de cacao	Media (mg/kg)	0.0328	0.1385	0.0694	0.0438	11.0014	16.8723	9.9024	16.4849
	Mínimo- máximo	0.0188- 0.0444	0.0604- 0.2226	0.0478- 0.093	0.0275- 0.0612	5.7068- 20.5792	14.7643- 18.3767	3.0194- 17.7552	3.983- 26.6934
90-94.99% de cacao	Media (mg/kg)	0.0339	0.1073	0.0875	0.0463	14.3552	18.6863	10.1023	18.361
	Mínimo- máximo	0.0272- 0.0415	0.0428- 0.2015	0.0851- 0.0918	0.0377- 0.0555	6.2003- 20.4125	14.3612- 23.5701	1.3954- 17.2534	11.757- 23.4507
95-99.99% de cacao	Media (mg/kg)	0.0268	0.1422	0.0894	0.0568	16.4713	15.3954	10.2705	35.4946
	Mínimo- máximo	0.0163- 0.0425	0.0375- 0.2641	0.077- 0.0962	0.043- 0.0691	7.1465- 38.6161	12.3726- 17.9497	2.6118- 27.2203	13.6742- 67.2733

Al analizar las concentraciones en función del porcentaje de cacao (70 – 99,99 %), no se observa un incremento lineal y uniforme de los metales con el aumento de la proporción de cacao. En el caso del Cd, los valores medios fueron más elevados en el intervalo 75 – 80 % (0.1898 mg/kg) en comparación con el resto de los grupos (0.0531 – 0.1422 mg/kg), lo que sugiere que la variabilidad no depende únicamente del contenido de cacao, sino también de factores asociados a la procedencia geográfica de la materia prima y a la composición del suelo de dónde se obtiene, tal y como señalan Sager (2012) y Lo Dico et al. (2018).

En el Pb tampoco se observa una tendencia definida, con medias de 0.1325 mg/kg en el 70 – 75 % y de 0.1700 mg/kg en el 75 – 80 %, seguidas de una reducción en los porcentajes

superiores (0.0438 – 0.0568 mg/kg). Este comportamiento indica que el contenido de Pb en chocolate no está directamente condicionado por el porcentaje de cacao, sino probablemente por procesos de contaminación externa o por la heterogeneidad de las muestras, en consonancia con lo señalado por Salama (2018) en chocolates egipcios.

Respecto al As, los valores se mantienen en un rango estrecho (0.027 – 0.115 mg/kg) en todos los intervalos de cacao, en línea con lo observado por Mohamed et al. (2020) en chocolates egipcios. Esto confirma que el cacao, a diferencia de otros alimentos de origen vegetal, no presenta una acumulación significativa de este metaloide en el producto final.

En cuanto a los metales esenciales, el Mn muestra una mayor variabilidad, con niveles más elevados en el rango 95 – 100 % (16.9 mg/kg, con un máximo de 38.6 mg/kg) que en los grupos intermedios. Esto coincide con lo descrito por Yanus et al. (2014) y Villa et al. (2015), quienes destacaron la importancia del cacao como fuente de Mn, aunque sin un patrón estrictamente dependiente del porcentaje de cacao. El Fe, por su parte, se mantiene relativamente constante (15 – 19 mg/kg), con valores inferiores a los reportados en granos de cacao por Arévalo-Gardini et al. (2017), lo que sugiere que el procesado reduce su concentración en el chocolate final.

Finalmente, el Hg presenta valores medios bajos y similares entre todos los intervalos (0.0486 – 0.0893 mg/kg), muy por debajo de lo observado en granos de cacao por Bertoldi et al. (2016). Esto confirma que la presencia de Hg en el chocolate final es reducida y no muestra relación con el porcentaje de cacao declarado.

En conjunto, el análisis comparativo de las distintas categorías de cacao indica que el contenido metálico en el chocolate no responde únicamente al porcentaje de cacao declarado en la etiqueta. Si bien en algunos casos se aprecian variaciones asociadas a intervalos concretos (como ocurre con el Cd o el Mn), la mayor parte de la variabilidad parece explicarse por otros factores. Así, el porcentaje de cacao puede contribuir parcialmente a las diferencias observadas, pero no constituye por sí solo un predictor fiable de la concentración de metales en el producto final.

3. Contribución del consumo de chocolate a la exposición a metales

De acuerdo con los datos de consumo obtenidos en el proyecto ENALIA 2 y los datos de contaminación de las muestras de chocolate analizadas en el presente trabajo, se ha estimado

la contribución del consumo de chocolate a la exposición a metales. En la siguiente tabla, se muestran los datos de ingesta de metales por consumo de chocolate estimados en base a las muestras analizadas, tanto para la población media (IDE más probable) como para la población con un mayor consumo (p95) de este producto (IDE máxima razonable).

Tabla 8. Ingestas Diarias Estimadas de metales pesados y esenciales a partir del consumo de chocolate

	IDE más probable ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$)	IDE máxima razonable ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$)
As	0.007	0.014
Cd	0.017	0.034
Hg	0.014	0.026
Pb	0.014	0.027
Mn	2.180	4.271
Fe	2.559	5.013
Cu	1.857	3.637
Zn	3.277	6.420

Para interpretar los resultados obtenidos se han comparado los valores estimados de ingesta con los valores de referencia toxicológicos establecidos para estos elementos. En el caso del Cd, la EFSA ha establecido una ingesta semanal tolerable (IST) de 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. Para facilitar la comparación con los valores obtenidos en este estudio, dicha IST puede expresarse como una ingesta diaria tolerable (IDT), dividiendo el valor semanal entre 7 días, lo que equivale a 0.357 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$. Los resultados evidencian que, en España, el consumo de chocolate en la media de la población adulta contribuye en un 4.76 % al alcanzar el valor de ingesta establecido. Mientras que, para el Hg los resultados indican que contribuye un 7.37 % a la IDT (0.19 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$).

Por otro lado, para caracterizar el riesgo de Pb y As, se debe calcular el MOE o margen de exposición comparando los niveles de ingesta estimados con los valores de BMDL establecidos por organismos internacionales para distintos efectos adversos observados asociados a la exposición a estos contaminantes. En el caso del plomo, un valor de BMDL₀₁ (1.50 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) para efectos cardiovasculares, BMDL₀₁ (0.50 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) para efectos de neurotoxicidad en el desarrollo y BMDL₁₀ (0.63 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) para efectos nefrotóxicos (EFSA, 2010). Y, para el As, un BMDL_{0.5} (0.06 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) para efectos asociados a un incremento en la incidencia de cáncer (EFSA, 2024a).

La comparación de los valores de ingesta estimada por consumo de chocolate con los valores de BMDL de referencia, mostró para el Pb unos valores de MOE muy bajos (64 y 81, respectivamente), para efectos de neurotoxicidad y nefrotoxicidad, así como para el arsénico y su efecto carcinogénico (13), lo que sugiere que el consumo de chocolate podría contribuir de forma relevante a la exposición dietética a metales pesados (EFSA CONTAM Panel, 2025).

No obstante, la interpretación de estos resultados debe hacerse siempre con cautela debido al bajo número de muestras analizadas. Además, habría que tener en cuenta el contexto de la exposición dietética total, ya que el chocolate constituye solo una de las posibles fuentes de metales en la dieta.

Respecto a los metales esenciales, todos ellos tienen una Ingesta Diaria de Referencia (IDR) establecida, siendo esta de 0.9 mg/día, 10-14 mg/día, 8-11 mg/día y 3 mg/día para el Cu, Fe, Zn y Mn, respectivamente (Martínez et al., 2022). Estas IDR no se alcanzan con una ingesta moderada de chocolate. En la misma línea, las Ingestas Diarias Tolerables (IDT) tampoco se han visto alcanzadas en las muestras analizadas respecto a los valores de referencia establecidos (Cu: 5 mg/día, Fe: 40 mg/día, Zn: 25 mg/día, Mn: 8 mg/día) (EFSA, 2023a; EFSA, 2024b; EFSA, 2024c; EFSA 2023b). Por ello, el consumo de chocolate no se asocia a ningún efecto beneficioso con relación a los requerimientos nutricionales de una persona adulta. No obstante, el aporte de estos elementos puede considerarse positivo en la medida en que contribuye a cubrir las necesidades diarias, sin comprometer la salud, ya que las concentraciones encontradas están muy por debajo de los valores de IDT establecidos.

CONCLUSIONES

- El método analítico basado en digestión ácida y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) optimizado para la determinación de metales en chocolate mostró un buen rendimiento en términos de veracidad, precisión y sensibilidad para la cuantificación de los elementos objeto de estudio, lo que respalda su aplicabilidad a matrices complejas como el chocolate. No obstante, el Pb presentó recuperaciones sistemáticamente elevadas y una desviación estándar relativamente alta, lo que sugiere la posible existencia de interferencias o de contaminación ambiental que dificultan su cuantificación exacta y requieren interpretar sus resultados con cautela.
- Tras la aplicación del método a una selección de muestras comerciales, se pudo determinar la presencia de todos los elementos evaluados. Las concentraciones detectadas de metales

pesados (Cd, As, Pb y Hg) fueron generalmente bajas, en consonancia con lo descrito en parte de la bibliografía consultada. En el caso del Cd, único metal regulado en este tipo de producto, los valores hallados fueron en todos los casos inferiores al límite máximo legal (0.8 mg/kg), lo que refleja un cumplimiento generalizado de la normativa vigente.

- Los elementos esenciales Fe, Mn, Cu y Zn se detectaron en todas las muestras, con una notable variabilidad entre productos. Esta variación se relaciona presumiblemente con factores como el origen geográfico del cacao o las diferencias en los procesos de elaboración.
- Si bien en algunos casos se observaron variaciones en el contenido de metales que podrían estar relacionadas con un mayor porcentaje de cacao en las muestras, este factor, por sí solo, no resultó ser determinante en la concentración final de metales en el producto
- La estimación de la ingesta, basada en los niveles de metales detectados en las muestras analizadas, indica que el consumo de chocolate en España contribuye a cubrir los requerimientos diarios de determinados metales esenciales. Sin embargo, también representa una fuente de exposición a metales pesados, aunque en proporciones muy bajas respecto a los valores de referencia toxicológicos establecidos.

BIBLIOGRAFÍA

- AESAN – Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2021). Informe del Comité Científico de la AESAN sobre la exposición dietética al cadmio en la población española. Disponible en:
https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/CADMIO.pdf [Consultado 31-08-2025].
- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (ACSA) (2019). *V Estudio de Dieta Total en Cataluña*. Barcelona: Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, Generalitat de Catalunya.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2015). Enalia 2. Encuesta Nacional de Alimentación en población adulta, mayores y embarazadas. Disponible en:
http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/enalia_2.htm

- Agraria.pe (2023). Producción global de cacao en la campaña 2023/2024. Disponible en: <https://agraria.pe/noticias/icco-produccion-mundial-de-cacao-habria-alcanzado-las-4-449--36601>
- Alagic, S., Šabanović, M., Vranic, D. y Hasanagic, D. (2015). ‘Content of some essential metals in chocolate from different manufacturers’. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 44, pp. 17–20.
- Alloway, B.J. (2013). Sources of heavy metals and metalloids in soils. In: *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*. 3rd ed. Dordrecht: Springer, pp. 11–50. doi: 10.1007/978-94-007-4470-7. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-94-007-4470-7.pdf>
- AOAC (2016). *Official Methods of Analysis of International*. 17th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C.O., Baligar, V.C. y He, Z.L. (2017). ‘Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru’. *Science of the Total Environment*, 605–606, pp. 792–800.
- Bedriñana-Castro, M., Gutiérrez, C., Ramírez, A. y Paredes, C. (2023). ‘Assessment of heavy metal exposure through hazard quotient and hazard index in food’. *Environmental Research*, 220, 115244.
- Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F. y Larcher, R. (2016). ‘Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products’. *Food Control*, 65, pp. 46–53.
- Bloom, G. y Foodwatch (2024). *Mercury in canned tuna: results of a European market survey*. Berlin: Foodwatch.
- Bloomaert, N., Vanderschueren, R., Van Dael, M. y Smolders, E. (2024). ‘Cadmium speciation in cocoa beans and its impact on food safety’. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(4), pp. 1825–1833.
- Clarkson, T.W. y Magos, L. (2006). ‘The toxicology of mercury and its chemical compounds’. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(8), pp. 609–662.
- Codex Alimentarius Commission (2017). *Report of the 49th Session of the Codex Committee on Contaminants in Foods*. Roma: FAO/WHO.

- Consumer Reports (2024). *Dark chocolate contains cadmium and lead*. Yonkers, NY: Consumer Reports. Disponible en: <https://www.consumerreports.org/food-safety/heavy-metals-in-dark-chocolate-a1131532138/>
- CSIC (2022). *Un estudio del CSIC concluye cuáles son los pescados más seguros por sus bajos niveles de mercurio*. Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España. Disponible en: https://www.csic.es/sites/default/files/d7/noticias/10octubre2022pescado_mercurio_0.pdf [Consultado 07-sept-2025].
- EFSA – European Food Safety Authority (2009). ‘Cadmium in food’. *EFSA Journal*, 7(980), pp. 1–139. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.980> [Consultado 31-08-2025].
- European Food Safety Authority (EFSA). (2010). “Scientific opinion on lead in food”. *EFSA Journal*, 8(8), 1570. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1570
- EFSA – European Food Safety Authority (2012). ‘Scientific Report on dietary exposure to cadmium in the European population’. *EFSA Journal*, 10(1), 2551.
- EFSA – European Food Safety Authority (2020). ‘Risk assessment of lead, cadmium, mercury and arsenic in food’. *EFSA Journal*, 18(6), 6082.
- EFSA Scientific Committee (2023a). *Re-evaluation of the existing health-based guidance values for copper and exposure assessment from all sources*. *EFSA Journal*, 21(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7728>
- EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) (2023b). *Scientific opinion on the tolerable upper intake level for manganese*. *EFSA Journal*, 21(12), Article e8413. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8413>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J.K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L.R., Leblanc, J.-C., Nebbia, C.S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Vleminckx, C., Wallace, H., Barregård, L., Benford, D. y Schwerdtle, T. (2024a). *Update of the risk assessment of inorganic arsenic in food*. *EFSA Journal*, 22(1), e8488. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8488>

- EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) (2024b). *Scientific opinion on the tolerable upper intake level for iron*. *EFSA Journal*, 22(6), Article e8819. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8819>
- EFSA – European Food Safety Authority (2024c). *Overview on Tolerable Upper Intake Levels for vitamins and minerals*. *EFSA Journal*. Version 11 (August 2025).
- Elika Seguridad Alimentaria (2023). Ficha de peligros: Cadmio. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/cadmio/>
- EURACHEM (2020). *EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 3rd ed. Disponible en: <https://www.eurachem.org> [Consultado 31-08-2025].
- European Food Safety Authority (EFSA) CONTAM Panel (2025). *Scientific report on dietary exposure to lead in the European population*. *EFSA Journal*, 23(8), e9577. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2025.9577>
- Fageria, N.K. (2009). *The use of nutrients in crop plants*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- FAO (1996). *Rome Declaration on World Food Security and World Food Summit Plan of Action*. Roma: FAO.
- FAO (2021). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2021*. Roma: FAO.
- Gaetke, L.M. y Chow, C.K. (2003). ‘Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients’. *Toxicology*, 189(1–2), pp. 147–163.
- Gilmour, C.C., Bullock, A.L., McBurney, A., Podar, M. y Elias, D.A. (2013). ‘Mercury methylation by novel microorganisms from new environments’. *Environmental Science & Technology*, 47(20), pp. 11810–11820.
- IARC – International Agency for Research on Cancer (1993). *Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Volume 58. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- IARC – International Agency for Research on Cancer (2006). *Inorganic and organic lead compounds*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Volume 87. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- IARC – International Agency for Research on Cancer (2012). *Arsenic, metals, fibres, and dusts*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Volume 100C. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

- IARC – International Agency for Research on Cancer (2019). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 100C: Arsenic, metals, fibres, and dusts*. Lyon: IARC.
- ICCO – International Cocoa Organization (2021). *Guía global para los sistemas de cultivo de cacao*. Disponible en: <https://www.icco.org/wp-content/uploads/B27407-Cocoa-Grower-Guide-Spanish-CFW-v7-interactive.pdf>
- Jackson, B.P., Taylor, V., Punshon, T. y Cottingham, K.L. (2024). ‘Cadmium and lead exposure from chocolate consumption in the United States’, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 41(2), pp. 235–245.
- Jomova, K. y Valko, M. (2011). ‘Advances in metal-induced oxidative stress and human disease’. *Toxicology*, 283(2–3), pp. 65–87.
- Lo Dico, G.M., Galvano, F., Dugo, G., D’Ascenzi, C., Macaluso, A., Vella, A., Giangrosso, G., Ferrantelli, V. y Di Bella, G. (2018). ‘Toxic metals in cocoa products from the Italian market: Risk assessment’. *Food and Chemical Toxicology*, 118, pp. 561–572.
- Martínez, J.A., Cámara, M., Giner, R.M., González, E., López, E., Mañes, J., Portillo, M.P., Rafecas, M., Estruch, R., Ros, G., Tur, J.A., Marcos, A. and San-Cristóbal, R.. (2022). “Ingestas nutricionales de referencia (INR) de minerales y vitaminas para la población española (2019)”. *Revista Española de Salud Pública*, 96, e202203034. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL96/CARTA/RS96C_202203034.pdf.
- Meharg, A.A. y Zhao, F.J. (2012). *Arsenic & Rice*. Dordrecht: Springer.
- Médiéu, A., Perrier, H., Lavoie, M. y Bellanger, C. (2024). ‘Mercury contamination trends in Pacific tuna’. *Marine Pollution Bulletin*, 198, 115645.
- Mohamed, R., El-Sharkawy, M. y Ahmed, H. (2020). ‘Assessment of heavy metals in chocolate and cocoa powder consumed in Egypt’. *Heliyon*, 6(7), e04395. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04395.
- Müller, L., Schmid, A., Reimann, C. y Birke, M. (2023). ‘Cadmium exposure through cocoa consumption in Europe’. *Food Control*, 144, 109396.
- Nicklisch, S.C.T., Bonito, L.T. y Sandin, S.A. (2021). ‘Geographic variation in mercury concentrations in tuna’. *Environmental Science & Technology*, 55(14), pp. 9729–9739.

- Núñez, O., Fernández-Navarro, P., Martín-Méndez, I., Bel-Lan, A., Locutura, J., López-Abente, G. y Fernández, M.A. (2017). 'Association between heavy metal exposure and cancer mortality in Spain: an ecological study'. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(6), pp. 1036–1043.
- Parks, J.M. y Jobe, R.T. (2011). 'Metabolic pathways of microbial mercury methylation'. *Annual Review of Microbiology*, 65, pp. 453–479.
- Peixoto, R.R.A., Matos, W.O., dos Santos, E.J. y Herrmann, A.B. (2016). *Validation of methods for determination of metals in chocolate using ICP-MS and NIST SRM 2384 as a certified reference material. Food Chemistry*, 190, pp. 364–370.
- Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. y Schulin, R. (2013). 'Zinc and its importance for human health: An integrative review'. *Journal of Research in Medical Sciences*, 18(2), pp. 144–157.
- Sager, M. (2012). 'Cadmium in chocolate – Analysis of samples from the Austrian market'. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 5(2), pp. 120–130.
- Salama, A.K. (2018). 'Monitoring of cadmium and lead levels in chocolate in Egypt'. *Toxicology Reports*, 5, pp. 751–755.
- Statista (2016). *¿Qué países consumen más chocolate?* [Gráfico]. Publicado el 1 de noviembre de 2016. Basado en datos de Syndicat du Chocolat. Disponible en: <https://es.statista.com/grafico/6525/que-paises-consumen-mas-chocolate/>
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K. y Sutton, D.J. (2012). 'Heavy metal toxicity and the environment'. *EXS*, 101, pp. 133–164.
- Tello, A., Rodríguez, J., Martínez, M. y Gutiérrez, E. (2023). 'Human health risk assessment of heavy metals in food: application of hazard index'. *Science of the Total Environment*, 872, 162123.
- Uluozlu, O.D., Tuzen, M., Mendil, D. y Soylak, M. (2019). 'Assessment of trace metal contamination in vegetables grown near industrial areas in Turkey'. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191, 706.
- Unión Europea (2004). *Reglamento (CE) nº 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, 13.11.2004, pp. 4–17.

- Unión Europea (2006). *Reglamento (CE) n° 2023/2006 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2006, sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos*. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 384, 29.12.2006, pp. 75–78.
- Van Acker, T., Theiner, S., Bolea-Fernandez, E., Vanhaecke, F. y Koellensperger, G. (2023). *Inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Nature Reviews Methods Primers*, 3, 52. <https://doi.org/10.1038/s43586-023-00235-w>
- Vanderschueren, R., Bloomaert, N., Van Dael, M. y Smolders, E. (2022). ‘Cadmium partitioning and processing in Theobroma cacao beans: impact on cadmium content of cocoa products’. *Food Research International*, 157, 111429.
- Vicente, E., López, J., Martínez, A. y Sánchez, R. (2021). ‘Migration of heavy metals from food contact materials: risk for food safety’. *Food Packaging and Shelf Life*, 29, 100714.
- Villa, C., Prat, S., Terrado, E., Medina-Rodríguez, E., Jové, P. y Matute, P. (2015). ‘Trace element content of Spanish commercial cocoa powders’. *Food Chemistry*, 172, pp. 476–482.
- The Wall Street Journal (WSJ) (2024). Cocoa Farmers Uproot Their Plants Despite Record Prices. Recuperado de: <https://www.wsj.com/finance/commodities-futures/africa-cocoa-production-prices-reseeding-e4d19821>
- World Health Organization (2023). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: 600 million cases, 420 000 deaths annually*. Disponible en: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/who-estimates-of-the-global-burden-of-foodborne-diseases> [Consultado 07-09-2025].
- Yanus, R.L., de Souza, S.B., Barbosa, F. y Krug, F.J. (2014). ‘Manganese and other trace elements in cocoa and chocolate from Brazil determined by ICP-MS’. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(1), pp. 21–27.
- Zhao, F., Ma, J., Zhu, Y. y Tang, Z. (2020). ‘Accumulation of heavy metals in vegetables cultivated in contaminated soils in China’. *Environmental Pollution*, 263, 114667.