



APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA EN LA CUANTIFICACIÓN DE CADMIO EN CACAO DE LOS DEPARTAMENTOS DE CAQUETÁ Y SANTANDER POR VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA

Application of the response surface methodology for the optimization of cadmium quantification in cocoa samples from the Caquetá and Santander departments using anodic stripping voltammetry

Jefferson Aristizábal Tierradentro¹

 <https://orcid.org/0000-0001-6063-9533>

 je.aristizabal@udla.edu.co

Francis Stiven Sanchez García³

 <https://orcid.org/0000-0001-6579-4815>

 fr.sanchez@udla.edu.co

Andres Felipe Lugo Vargas²

 <https://orcid.org/0000-0002-4633-7173>

 alugov@unal.edu.co

Jaime Fernando Martínez Suárez⁴

 <https://orcid.org/0000-0003-2381-3509>

 jai.martinez@udla.edu.co

¹Químico, Programa de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de la Amazonia.

³Químico, Programa de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de la Amazonia.

²Magister, Maestría en toxicología, Universidad Nacional de Colombia.

⁴Doctor, Programa de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de la Amazonia.

RESUMEN

Se estudió el comportamiento electroquímico del ion bismuto (Bi^{3+}) en electrodos de carbón vitreo (GC) y oro (Au) por voltamperometría cíclica (CV). Para ambos electrodos el proceso redox del ion Bi^{3+} es cuasireversible, con una potencial de pico catódico 0,10 V y -0,16 V para reducción de Bi^{3+} a Bi^0 sobre los electrodos de Au y GC, respectivamente. Para el electrodo de GC la relación de corriente de pico (I_{pa}/I_{pc}) es cuatro veces mayor con respecto electrodo Au en ácido clorhídrico (HCl) 0,1 M. Además, se realizaron un diseño Box-Behnken y compuesto central para optimizar la película de bismuto sobre GC y parámetros electroanalíticos por voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial (DPASV) para la determinación de cadmio (Cd^{2+}). Se evaluó la influencia de $[\text{Bi}^{3+}]$, $E_{\text{depósito}}$ y $t_{\text{depósito}}$ para la película de bismuto, y E_{pulso} y t_{pulso}

Cómo citar:

Fecha recepción: 14 de Febrero de 2025 / Fecha Aprobación: 12 de Marzo 2025 / Fecha Publicación: 27 de Agosto 2025

Aristizábal Tierradentro, J., Lugo Vargas, A. F., Sanchez Garcia, F. S. & Martínez Suárez, J. F. (2025). *Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en la cuantificación de cadmio en cacao de los departamentos de caquetá y santander por voltamperometría de redisolución anódica*. Revista. FAGROPEC. Vol. 17(1), ppt 28-48. <https://doi.org/10.47847/fagropec.v17n1a2>



Este artículo puede compartirse bajo la Licencia Creative Commons (CC BY 4.0).

Rev. FAGROPEC Vol. 17 Num. 1, enero - junio de 2025

para los parámetros electroanalíticos. Los parámetros optimizados fueron $[Bi^{3+}] = 5 \text{ mg/L}$, $E_{\text{depósito}} = -1100 \text{ mV}$, $t_{\text{depósito}} = 650 \text{ s}$, $E_{\text{pulso}} = 160 \text{ mV}$ y $t_{\text{pulso}} = 20 \text{ ms}$. Bajo la combinación óptima de parámetros se realizó una curva de calibración en un rango de concentraciones de 0,05 a 0,4 mg/L con un límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de 0,032 y 0,099 mg/L. El procedimiento analítico propuesto se aplicó para cuantificar Cd^{2+} en muestras de semilla de cacao de los departamentos de Caquetá y Santander, y fue comparado por espectroscopia de absorción atómica (AAS) con resultados satisfactorios.

PALABRAS CLAVE:

Box-Behnken, compuesto central y película de bismuto.

ABSTRACT

The electrochemical behavior of the bismuth ion (Bi^{3+}) was studied on glassy carbon (GC) and gold (Au) electrodes using cyclic voltammetry (CV). For both electrodes, the redox process of Bi^{3+} was found to be quasi-reversible, with cathodic peak potentials of 0.10 V and -0.16 V for the reduction of Bi^{3+} to Bi^0 on Au and GC electrodes, respectively. For the GC electrode, the peak current ratio (I_{pa}/I_{pc}) was four times higher than that of the Au electrode in 0.1 M hydrochloric acid (HCl). Additionally, a Box-Behnken design and a central composite design were implemented to optimize the bismuth film deposition on GC and the electroanalytical parameters for cadmium (Cd^{2+}) determination using differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV). The influence of $[Bi^{3+}]$, deposition potential ($E_{\text{deposition}}$), and deposition time ($t_{\text{deposition}}$) on the bismuth film was evaluated, along with pulse amplitude (E_{pulse}) and pulse duration (t_{pulse}) for the electroanalytical parameters. The optimized parameters were $[Bi^{3+}] = 5 \text{ mg/L}$, $E_{\text{deposition}} = -1100 \text{ mV}$, $t_{\text{deposition}} = 650 \text{ s}$, $E_{\text{pulse}} = 160 \text{ mV}$, and $t_{\text{pulse}} = 20 \text{ ms}$. Under the optimal parameter combination, a calibration curve was constructed in a concentration range of 0.05 to 0.4 mg/L, achieving a limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 0.032 mg/L and 0.099 mg/L, respectively. The proposed analytical procedure was applied for Cd^{2+} quantification in cocoa seed samples from the Caquetá and Santander departments and was validated through atomic absorption spectroscopy (AAS), yielding satisfactory results.

KEYWORDS:

Box-Behnken, central composite, and bismuth film.

Introducción

El cacao, originario de la selva amazónica, se planta en todos los climas tropicales y su consumo, aunque sigue dominado por Europa y América del Norte, aumenta rápidamente en las economías emergentes de Asia, América Latina y Oriente Medio. El sector mundial del cacao tuvo un valor de 44.000 millones de dólares estadounidenses en 2019 y la producción de granos de cacao se ha duplicado en los últimos treinta años. En Colombia cuenta con una producción promedio anual de 57.000 toneladas, en donde el departamento del Caquetá aporta 3006 toneladas de esta producción, implementando diversas estrategias para incrementar producción a través de la promoción del cultivo de cacao como sustituto a los cultivos ilícitos y programas de agricultura sostenible. A pesar de su importancia, el desarrollo de estos cultivos y la exportación de los granos de cacao ha presentado ciertas limitantes debido principalmente a la acumulación de metales pesados como el Cadmio (Cd). El Cd, es uno de los tres metales más abundante en el suelo, agua y aire, su concentración puede aumentar por actividades antropogénicas e industriales. El metal es absorbido por las plantas inhibiendo procesos fisiológicos, reduciendo su crecimiento, actividad fotosintética, transpiración y contenido de clorofilas. En las plantas el Cd se moviliza a las hojas y tejidos de almacenamiento como las semillas del cacao por lo que presenta disponibilidad para animales y humanos directamente o a través de la cadena trófica. Por esta razón, el monitoreo de los metales pesados, en especial el Cd en los alimentos es de vital importancia debido a su alta toxicidad, naturaleza ubicua y bioacumulación. El Cd se bioacumula en riñones, huesos, tracto respiratorio, aparato digestivo y sistema nervioso central. En las mujeres y lactantes pueden generar daños estructurales y funcionales. Además, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IACR, por siglas en inglés) clasificó el Cd y sus componentes como carcinógenos del grupo 1. Como respuesta a este riesgo se han implementado regulaciones para garantizar las concentraciones de Cd en productos derivados del cacao. Por ejemplo, la Unión Europea a través del reglamento N° 488/2014 que tiene por objetivo regular el contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios.

Entre las técnicas analíticas para la determinación de Cd se encuentran la Espectroscopia de Absorción Atómica (AAS), Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), Espectroscopia de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente inductivamente (ICP-OES), Espectroscopia de Fluorescencia de Rayos X (XFS), y Espectrometría de Fluorescencia Atómica (AFS). las cuales son herramientas analíticas costosas, con tiempos de análisis prolongados y requieren personal altamente cualificado. En este sentido, surgen las técnicas electroquímicas como opción adecuada debido a su bajo costo, alta sensibilidad, equipos portátiles y tiempos cortos de análisis. Una común técnica para el análisis de metales en alimentos es la voltamperometría de redisolución anódica (ASV) en electrodos de carbón vitreo (GC), oro (Au), entre otros. Además, de la modificación de la superficie del electrodo con película de mercurio (MFE) que permite mejorar los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Sin embargo, su principal inconveniente es el empleo de mercurio, un elemento de altamente tóxico. De este modo, se requiere metales ambientalmente amigables y con propiedades electroanalíticas similares al mercurio. Aunque el bismuto es un metal pesado, presenta una

baja toxicidad, una amplia ventana de potencial, una preparación sencilla, insensibilidad parcial al oxígeno disuelto y capacidad para formar aleaciones con diferentes metales. Aunado a esto, se requieren diseños experimentales que permitan optimizar condiciones sin tener que realizar un gran número de experimentos, con lo cual se tenga una reducción del tiempo experimental, así como de los costos de reactivos y el uso de equipos. Dentro de este tipo de diseño se encuentran los basados en la metodología de superficie de respuesta, donde se pueden mencionar el diseño tipo Box Behnken y el Diseño de Compuesto Central (CCD), los cuales permiten encontrar valores óptimos de las variables de control para obtener las respuestas deseadas como máximos o mínimos.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento electroquímico del ion bismuto en electrodos de GC y Au, optimizar la película de bismuto y parámetros electroanalíticos empleando diseños Box Behnken y compuesto central, para la determinación de cadmio en muestras de cacao obtenidas de los departamentos de Caquetá y Santander.

Metodología

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico. El ácido clorhídrico (HCl, Merck) se utilizó para preparar el medio electrolítico. El nitrato de bismuto pentahidratado ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich) se empleó para formación in-situ de la película de bismuto. El nitrato de cadmio tetrahidratado ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich) se utilizó para la preparación de soluciones estándar de 4000 mg/L. El HCl y ácido nítrico (HNO_3 , PanReac) se emplearon para la digestión del material vegetal. El cloruro de lantano (LaCl_3 , Sigma Aldrich) se utilizó para evitar interferencias de calcio y magnesio en la de determinación por espectroscopia de absorción atómica. Todas las soluciones fueron preparadas en agua desionizada. El material de vidrio se limpió con una solución de HNO_3 10%, y posteriormente fue lavado con agua desionizada.

Equipos

Las medidas electroquímicas se realizaron por voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial (DPASV) en un potenciostato/galvanostato 797 VA Computrace (Metrohm, Suiza). Se utilizó una celda convencional de tres electrodos: un electrodo axilar de varilla de platino, un electrodo de referencia de doble unión $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}$ 3 M y electrodos de trabajo de oro (Au) y carbono vítreo (GC). Los electrodos se limpiaron mediante pulido mecánico sobre un paño de microfibras recubierto con una suspensión de alúmina de tamaño de partícula $0,3 \mu\text{m}$ y posteriormente se colocó durante 90 s en un limpiador ultrasónico DK-1000PF (DK SONIC, China). Antes de cada determinación se realizó a los electrodos de trabajo una limpieza electroquímica ($E_{\text{aplicado}} = 0,3 \text{ V}$ durante 60 s). Además, los electrodos se activaron mediante CV mediante 50 ciclos a una velocidad de barrido de 20 mV/s , aplicando un barrido de potencial de -1 V a 1 V en el medio electrolítico. Antes de cada determinación la solución se burbujeó con nitrógeno gaseoso (N_2) durante 60 s. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron a temperatura ambiente. Las medidas de absorción atómica se realizaron en

un espectrofotómetro Shimadzu AA-7000 (Shimadzu, Japón).

Efecto del material de electrodo

La determinación se realizó por CV en una solución que contenía 0,43 mg/L de Bi^{3+} en 0,1 M de HCl para los electrodos de GC y Au. El CV se realizó en una ventana de potencial de 0,5 a -0,4 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Optimización de la película de bismuto

Para la optimización de la película de bismuto se realizó un diseño Box Behnken, utilizando la voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial (DPASV) como técnica analítica. El diseño se empleó para determinar el efecto de la concentración de Bi^{3+} (2.0 a 8.0 mg/L), potencial de depósito (-1100 a 200 mV) y tiempo de depósito (200 a 800 s), en la corriente de pico anódico del cadmio (mA).

Optimización de los parámetros electroanalíticos de Cd^{2+}

La optimización de los parámetros electroanalíticos de Cd^{2+} se realizó por DPASV aplicando un diseño de compuesto central, evaluando el efecto del tiempo de pulso (200 a 800 s) y la amplitud de pulso (20 a 200 mV), sobre la corriente de pico anódico del cadmio.

Análisis Estadístico

Para los procesos de optimización se eligieron los modelos matemáticos que más se ajustaron a los valores experimentales, a través de la estimación del R^2 , R^2 ajustado y la no significancia de la falta de ajuste del modelo, incluyendo los términos significativos ($p < 0.05$) según el análisis de varianza (ANOVA). Adicionalmente se construyeron superficies de respuesta para observar los valores máximos de corriente de acuerdo con las variables independientes seleccionadas. Todos los análisis estadísticos fueron realizados a través del programa Design Expert 11.

Cuantificación de Cd^{2+} en semillas de cacao

Preparación de la muestra de cacao

Los frutos maduros de cacao (*Theobroma cacao L*) se obtuvieron de la parcela el “El Limón” en el Centro de Investigaciones Amazónicas “Cesar Augusto Estrada González”-MACAGUAL, Florencia-Colombia. Se recolectaron 3 mazorcas de los clones LUKER 40, CCN 51 y ICS, y luego se abrieron evitando el daño mecánico de las semillas (Figura 1). Posteriormente, se desgranaron las mazorcas y se almacenaron en refrigeración a -40 °C. Todas las semillas de un mismo clon se homogenizaron y se separaron en tres muestras. Cada fracción se sometió a un proceso de secado a 105 °C durante 12 h y se trituraron. Posteriormente, 10 g de cada fracción se colocaron en una mufla a 200 °C, y se incrementó la temperatura hasta 450 °C a una velocidad de 50 °C/h por periodo de 8 h. Luego, las cenizas obtenidas se le adicionaron 5 mL de HCl 6 M, y se evaporó el ácido en una plancha de calentamiento. Posteriormente, el residuo se agregó 10 mL de HNO_3 al 0.1 M, se tapó, y se dejó reposar por 1,5 horas. Finalmente, se filtró y se aforó a 25 mL con HNO_3 al 1%. El contenido se trasvasó a botellas de plásticas para su posterior análisis.

Figura 1.

Clones de cacao: a) LUKER 40, b) ICS y c) CCN 51



Voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial (DPASV)

Se realizó la preparación de 10 mL de cada solución de Cd^{2+} en el rango de 0,05 a 0,4 mg/L + 5,0 mg/L de Bi^{3+} en 0,1 M de HCl. La cuantificación de Cd^{2+} se realizó a partir de la optimización de película de bismuto y parámetros electroanalíticos. Para las muestras de cacao se tomaron 1 mL de la muestra pretratada en digestión ácida, se adicionó 9,0 mL de 5,0 mg/L de Bi^{3+} en 0,1 M de HCl.

Espectroscopia de absorción atómica (AAS)

Se realizó la preparación de 10 mL de cada solución de Cd^{2+} en el rango de 0,05 a 0,4 mg/L, con adicción 2 mg/L de LaCl_3 , las medidas se realizaron a una longitud de onda de 228,8 nm. Para las muestras de cacao se tomaron 5 mL de la muestra pretratada en digestión ácida, se adicionó 2 mg/L LaCl_3 , y se aforó a 10 mL con HCl 0,1 M. Posteriormente, se colocó 1 mL de solución para su posterior lectura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

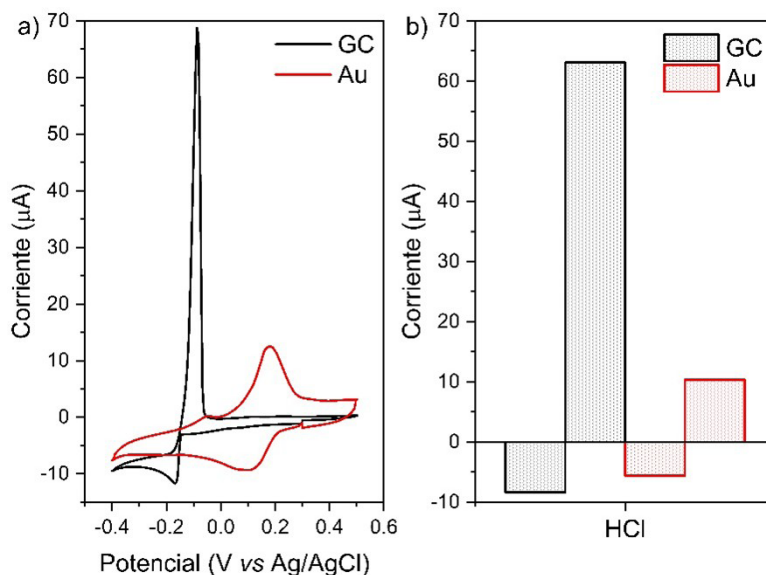
Efecto del material de electrodo

Los materiales de electrodo como GC y Au se estudiaron para la preparación de la película de bismuto debido a sus propiedades electroanalíticas (estabilidad química, baja porosidad y sobrepotencial de hidrógeno relativamente alto) y a razones prácticas (amplia disponibilidad y simplicidad de renovación de la superficie). La Figura 2a muestra los CVs de 0,43 mg/L de Bi^{3+} en 0,1 M de HCl para los electrodos de Au y GC, respectivamente. Varios aspectos interesantes son observados. Por ejemplo, para el electrodo GC

se observaron corrientes de pico (I_p) más altas con respecto al electrodo de Au (Figura 2b). Así, la relación de corriente de pico (I_{pa}/I_{pc}) resultó ser aproximada cuatro veces mayor para el electrodo de GC (7,56) con respecto Au (1,84). Por otro lado, para el electrodo de Au el potencial de pico catódico ($E_{pc} = 0,10$ V) se encuentra desplazado a potenciales menos catódicos con respecto a electrodo de GC ($E_{pc} = -0,16$ V), indicando la reducción de Bi^{3+} a Bi^0 se encuentra electrocalizada por el material de electrodo. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo reportado por otros autores. Para el proceso de reducción de Bi^{3+} en ambos electrodos se observó una cuasireversible cupla redox con un ΔE_p ($E_{pa} - E_{pc}$) de 80 y 78 mV para el electrodo de GC y Au, respectivamente. Además, no se observaron otros procesos redox para bismuto en los electrodos de GC y Au en solución de HCl como se ha reportado para otros medios electrolíticos. A partir de los resultados obtenidos, el GC es material de electrodo seleccionado para nuestros experimentos posteriores.

Figura 2.

a) CVs de 0,43 mg/L de Bi^{3+} en 0,1 M de HCl para los electrodos de Au y GC a una velocidad de barrido 100 mV/s. b) Corriente de pico a partir de los CVs.

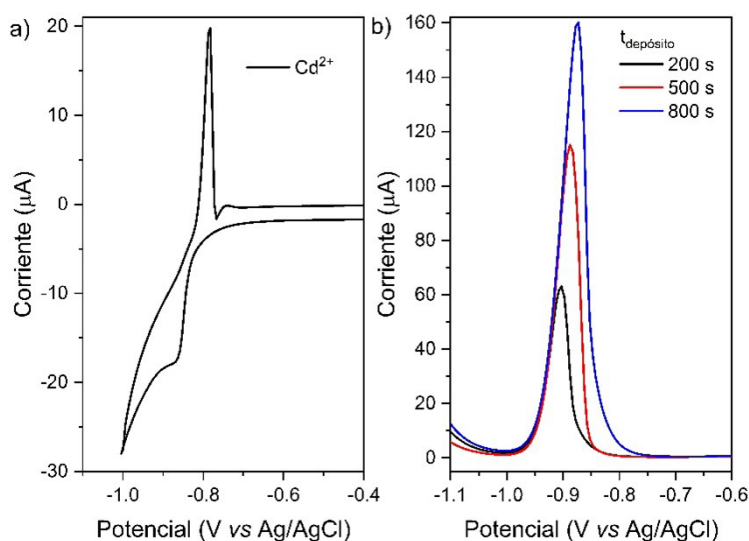


Optimización de la película de bismuto

La Figura 3a presenta el CV de una solución de 0,45 mg/L de Cd^{2+} en 0,1 M de HCl para el electrodo de GC. Un potencial de pico catódico a -0,87 V puede ser asignado a la reducción de Cd^{2+} a Cd^0 , y un potencial de pico anódico a -0,78 V puede ser asignado a la oxidación de Cd^0 a Cd^{2+} . Por otro lado, la Figura 3b muestra un DPASV de una solución de 0,45 mg/L de Cd^{2+} + $[Bi^{3+}] = 4,5$ mg/L en 0,1 M de HCl, bajo las condiciones de $E_{deposición} = -1100$ mV y variando el $t_{deposición}$ en 200, 500 y 800 s. Una señal es observada a -0,82 V característica de la oxidación de cadmio. A partir de la información suministrada por CV y los parámetros evaluados ($[Bi^{3+}]$, $E_{deposición}$ y $t_{deposición}$) en el DPASV se realizó el diseño Box Behnken para la optimización de la película de bismuto.

Figura 3.

a) CV de 0,45 mg/L de Cd^{2+} en 0,1 M de HCl para el electrodo de GC a una velocidad de barrido 100 mV/s. b) DPASV de 0,45 mg/L de Cd^{2+} + $[\text{Bi}^{3+}] = 4,5$ mg/L en 0,1 M de HCl, bajo las condiciones de Edepósito = -1100 mV y variando el tdepósito.



Se procedió a efectuar el diseño experimental planteado y se reporta en la Tabla 1 las respuestas obtenidas para las variables independientes evaluadas en los siguientes rangos fijados: $[\text{Bi}^{3+}] = 1, 4,5$ y 8 mg/L; Edepósito = -1100, -450 y 200 mV y tdepósito = 200, 500 y 800 s.

Tabla 1.

Resultados obtenidos de las variables de respuesta en corriente para $[\text{Bi}^{3+}]$, Edepósito y tdepósito

Ensayo	Variables Independientes			Variable de Respuesta
	$[\text{Bi}^{3+}]$ (mg/L)	$E_{\text{depósito}}$ (mV)	$t_{\text{depósito}}$ (s)	Corriente (A)
1	8	-450	200	1,0E-12
2	8	-450	800	1,9E-06
3	4,5	200	800	6,0E-09
4	1	-1100	500	1,1E-04
5	1	-450	200	7,5E-07
6	8	200	500	1,0E-12
7	4,5	-450	500	9,8E-06
8	4,5	-450	500	9,8E-06
9	4,5	200	200	1,0E-12
10	4,5	-1100	200	6,2E-05
11	4,5	-1100	800	1,6E-04
12	4,5	-450	500	9,8E-06
13	8	-1100	500	5,7E-05
14	4,5	-450	500	9,8E-06

15	1	200	500	9,3E-07
16	1	-450	800	3,0E-07
17	4,5	-450	500	9,8E-06

A continuación, se procedió a seleccionar el modelo que mejor se ajustara a los resultados de la variable respuesta, considerando los modelos evaluados en la Tabla 2, y se seleccionó el modelo cuadrático conforme a su $p < 0,05$

Tabla 2.

Modelos evaluados para la optimización de la película de bismuto

Fuente variación	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F	P*
Lineal	4,75E+02	1,58E+02	9,617	0,0530
Interacción	1,17E+02	3,89E+01	3,994	0,0515
Cuadrático	9,08E+01	3,03E+01	32,235	0,0002

Nota: Modelos significativos ($p < 0,05$)

Considerando el modelo cuadrático se procede a revisar la significancia y la falta de ajuste en relación con el intervalo de confianza del 95% mediante la prueba F que se observa en la Tabla 3.

Tabla 3.

Análisis de varianza del modelo ajustado a la variable de respuesta corriente

Fuente variación	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F	P	R2		% CV
Modelo	682,4	75,8	80,8	3,1E-06	0,9905	Significativo	2,6
Residual	6,6	0,9	-	-	-		-
Falta de ajuste	6,6	2,2	6,3	0,10	-	No significativo	-

Nota: $p < 0,05$ indica un modelo significativo, $p > 0,05$ indica una falta de ajuste no significativa, R2: Coeficiente de determinación, % CV: Coeficiente de variación

El análisis de varianza manifiesta que el modelo ajustado para la corriente de respuesta fue significativo, debido a su valor $p < 0,05$, además el modelo presentó una falta de ajuste no significativa $p > 0,05$. Además, el coeficiente de variación fue de tan solo 2,6 %, lo cual indica una mínima dispersión de los datos entre sí y con respecto a la media. El coeficiente de determinación fue de 0,9905 lo cual señala que el modelo cuadrático puede predecir el 99,05% de la variación de los datos. Una vez identificado el modelo adecuado, se procedió a realizar el análisis estadístico para evaluar la significancia y el efecto de los componentes del modelo (Tabla 4). Considerando los resultados obtenidos en la Tabla 4, se observa que el Edepósito es el factor que más influye en la variable de respuesta, presentando un efecto negativo, debido a que un menor Edepósito (potenciales negativos) el sistema tiene un mayor sobrepotencial y reduce la barrera energética para la transferencia de electrones, acelerando la cinética del proceso de depósito. Asimismo, la interacción $[Bi^{3+}]/t_{depósito}$ fueron el segundo factor más influyente en la variable de respuesta, presentando un efecto positivo, debido a que a mayor $t_{depósito}$ permite un

mayor paso de carga a través del sistema, lo que resulta en una mayor cantidad de metal (Bi) depositado. 48,50,51 Además, la interacción Edepósito/tdepósito presentó un menor efecto en el sistema estudiado. Por otro lado, se identifica que los factores $[Bi^{3+}]$, tdepósito, Edepósito, y las interacciones $[Bi^{3+}]/t_{depósito}$, $[Bi^{3+}]/E_{depósito}$, $E_{depósito}/t_{depósito}$, $[Bi^{3+}]/[Bi^{3+}]$, $E_{depósito}/E_{depósito}$ y $t_{depósito}/t_{depósito}$ son significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Tabla 4.

Efecto y grado de significancia de los factores del modelo aplicado a la optimización de la película de bismuto

Factor	Efecto	Error Estándar	P*
A	-3,2649	0,3426	2,9E-05
B	-6,3488	0,3426	3,3E-07
C	2,8982	0,3426	6,4E-05
AB	-3,2610	0,4844	2,7E-04
AC	3,8434	0,4844	9,6E-05
BC	1,9386	0,4844	5,2E-03
A ²	-2,3963	0,4722	1,4E-03
B ²	-1,1647	0,4722	4,3E-02
C ²	-3,5524	0,4722	1,3E-04

Nota: A: $[Bi^{3+}]$ (mg/L) y), B: $E_{depósito}$ (mV); C: $t_{depósito}$ (s). *Variables significativas ($p < 0,05$).

La Figura 4 muestra la distribución de los valores residuales, la cual se define como la diferencia entre los valores ajustados (modelo) y los valores experimentales. Como se puede evidenciar, los residuos siguen una distribución normal, donde la mitad de los valores son positivos (sobre la línea), y la otra mitad son valores negativos (bajo la línea). A su vez, la desviación máxima y mínima de estos valores es de ± 4 , indicando que el modelo presenta una desviación mínima entre el valor ajustado y el valor experimental. Por otro lado, En la Tabla 5 se observan los valores óptimos para $[Bi^{3+}]$, Edepósito, tdepósito que fueron 5 mg/L, -1100 mV y 650 s, respectivamente.

Figura 4.

Distribución de probabilidad normal de los residuos

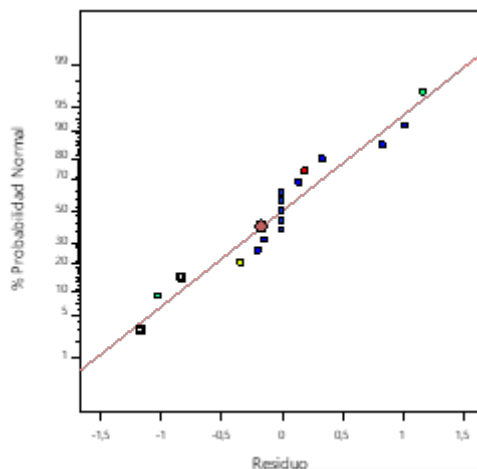


Tabla 5.

Parámetros optimización de la película de bismuto por Box Behnken

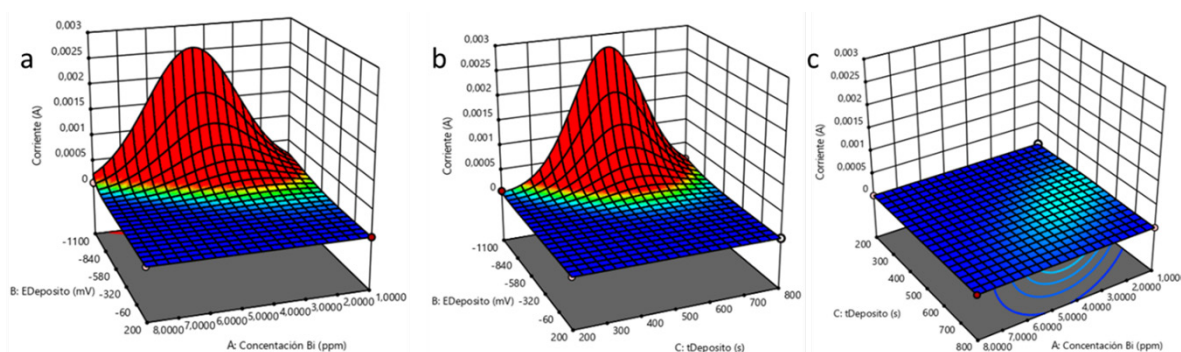
Parámetro	Valor óptimo
[Bi ³⁺] (mg/L)	5,0
Edepósito (mV)	-1100
tdepósito	650

En la Figura 5 se observa el efecto de cada una de las interacciones y su relevancia sobre el método. Así, el orden decreciente del efecto de cada parámetro fue $E_{\text{depósito}} > [\text{Bi}^{3+}] > t_{\text{depósito}}$.

La Figura 5a y 5b muestra la gráfica de superficie respuesta para la corriente como una función de $[\text{Bi}^{3+}]$ y $t_{\text{depósito}}$, respectivamente. Para ambos parámetros se puede observar que $E_{\text{depósito}}$ entre -1100 a 600 mV presenta un crecimiento de la corriente. Sin embargo, para el rango de potencial entre 600 a 200 mV se observa la disminución de la corriente. Además, en la Figura 5c se observa un mínimo incremento de la corriente para la $[\text{Bi}^{3+}]$ y $t_{\text{depósito}}$, debido que estos parámetros presentan un menor efecto en el método con respecto al $E_{\text{depósito}}$.

Figura 5.

Superficie de respuesta Box Behnken para las interacciones entre los parámetros: a) $[\text{Bi}^{3+}]/E_{\text{depósito}}$, b) $t_{\text{depósito}}/E_{\text{depósito}}$, c) $[\text{Bi}^{3+}]/t_{\text{depósito}}$.



La optimización de la película de bismuto se ajusta al diseño estadístico a partir de la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Óptimo} = & -11,53 - (3,26 \times A) - (6,35 \times B) + 2,90 \times C - (3,26 \times AB) + 3,84 \times AC + 1,94 \times BC - (2,40 \times A^2) \\ & - (1,16 \times B^2) - (3,55 \times C^2) \end{aligned}$$

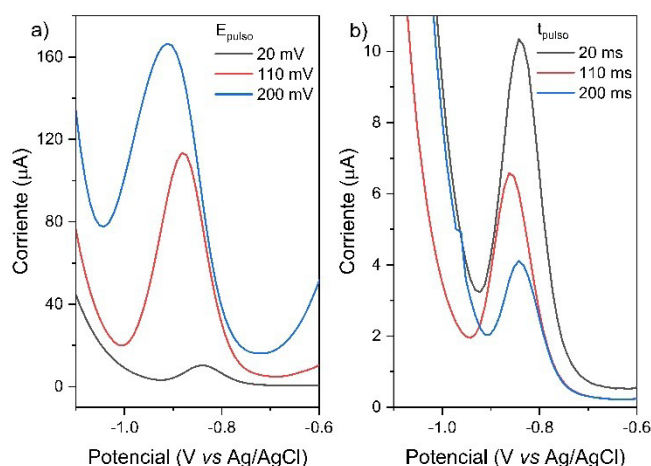
Donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales. La anterior ecuación es válida para $[\text{Bi}^{3+}]$ entre 1-8 mg/L (A), Edepósito entre -1100 a 200 mV (B) y $t_{\text{depósito}}$ en el intervalo 200-800 s (C).

Optimización de los parámetros electroanalíticos de Cd^{2+}

A partir de la optimización de la película de bismuto, se procedió a optimizar los parámetros electroanalíticos de Cd^{2+} . La Figura 6a y 6b muestra los DPASV para una solución de 0,45 mg/L de Cd^{2+} + 5,0 mg/L de Bi^{3+} en 0,1 M de HCl evaluando E_{pulso} y t_{pulso} , respectivamente. Cuando se incrementa E_{pulso} de 20 a 200 mV a un t_{pulso} de 20 ms se observa un incremento de la corriente de pico de aproximadamente 14,5 veces, y un desplazamiento catódico del potencial de pico asignado a la oxidación de Cd. Así, para 20, 110 y 200 mV los potenciales de pico anódico fueron -0,84; -0,88 y -0,91 V, respectivamente (Figura 6a). Por otro lado, cuando el E_{pulso} permanece constante a 20 mV, el t_{pulso} presenta una relación inversa con el corriente de pico (Figura 6b). Por ejemplo, para 20 ms se obtuvo una corriente de 8,04 μA , y para 200 ms fue 2,60 μA . A partir de los parámetros evaluados E_{pulso} y t_{pulso} en el DPASV se realizó un diseño de compuesto central para la optimización de los parámetros electroanalíticos.

Figura 6.

DPASV de 0,45 mg/L de Cd^{2+} + 5,0 mg/L de Bi^{3+} en 0,1 M de HCl: a) t_{pulso} de 20 ms y variando el E_{pulso} . b) E_{pulso} 20 mV y variando el t_{pulso} .



Luego de optimizar la película de bismuto sobre el electrodo GC, se procedió a efectuar el diseño experimental planteado para la optimización de los parámetros electroanalíticos para la determinación de Cd^{2+} , los cuales se reportan en la Tabla 6 las respuestas obtenidas para las variables independientes evaluadas en los siguientes rangos fijados de t_{pulso} 20, 110 y 200 ms, y E_{pulso} 20, 110 y 200 mV.

Tabla 6.

Resultados obtenidos de las variables de respuesta en corriente para t_{pulso} y E_{pulso} .

Ensayo	Variables Independientes		Variable de Respuesta
	t_{pulso} (ms)	E_{pulso} (mV)	Corriente (A)
1	20	20	8,04E-06
2	110	110	2,25E-05
3	110	200	1,06E-05

4	200	20	2,68E-06
5	110	20	5,21E-06
6	20	200	1,17E-04
7	110	110	2,25E-05
8	110	110	2,25E-05
9	20	110	9,98E-05
10	200	110	1,26E-05
11	110	110	2,25E-05
12	200	200	2,48E-06
13	110	110	2,25E-05

A continuación, se procedió a seleccionar el modelo que mejor se ajustara a los resultados de la variable respuesta, considerando los modelos evaluados en la Tabla 7, se seleccionó el modelo cuadrático conforme a su $p < 0,05$.

Tabla 7.

Modelos evaluados para la optimización de los parámetros electroanalíticos

Fuente de variación	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F	P*
Lineal	10,04	5,02	7,79	9,1E-02
Interacción	1,90	1,90	3,76	8,5E-02
Cuadrático	4,33	2,16	2,16	2,6E-05

Nota: Modelos significativos ($p < *0,05$)

Considerando el modelo cuadrático se procede a revisar la significancia y la falta de ajuste en relación con el intervalo de confianza del 95% mediante la prueba F que se observa en la Tabla 8.

Tabla 8.

Análisis de varianza del modelo ajustado a la variable de respuesta corriente

Fuente de variación	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F	P	R2		% CV
Modelo	16,268	3,254	101,924	2,21E-06	0,9865	Significativo	1,61
Residual	0,223	0,032	-	-	-		-
Falta de ajuste	0,223	0,075	5,300	0,58	-	No significativo	-

Nota: $p < 0,05$ indica un modelo significativo, $p > 0,05$ indica una falta de ajuste no significativa, R2: Coeficiente de determinación, % CV: Coeficiente de variación

El análisis de varianza manifiesta que el modelo ajustado para la corriente de respuesta fue significativo, debido a su valor $p < 0,05$. Además, el modelo presentó una falta de ajuste no significativa $p > 0,05$. El coeficiente de variación fue de 1,61 %, lo cual indica una mínima dispersión de los datos entre sí y con respecto a la media. El coeficiente de determinación fue de 0,9865 lo cual señala que el modelo cuadrático puede predecir el 98,65 % de la variación de los datos. Una vez identificado el modelo adecuado, se procedió a realizar el análisis estadístico para evaluar la significancia y el efecto de los

componentes del modelo (Tabla 9)

Tabla 9.

Efecto y grado de significancia de los factores del modelo aplicado a la optimización de los parámetros electroanalíticos

Factor	Efecto	Error estándar	P*
A	-1,17	0,073	8,87E-07
B	0,55	0,073	1,30E-04
AB	-0,69	0,089	1,15E-04
A ²	0,32	0,108	2,01E-02
B ²	-0,34	0,108	8,26E-06

Nota: A: t_{pulso} (ms) y B: E_{pulso} (mV). *Variables significativas ($p < 0,05$).

Considerando los resultados obtenidos en la Tabla 9, se observa que el t_{pulso} es el factor que más influye en la variable de respuesta, presentando un efecto negativo. Luego se encuentran las interacciones $t_{\text{pulso}}/E_{\text{pulso}}$ y $E_{\text{pulso}}/E_{\text{pulso}}$. Además, la interacción $t_{\text{pulso}}/t_{\text{pulso}}$ fue la que presentó un menor efecto. Por otro lado, se identifica que todos los factores t_{pulso} , E_{pulso} , $t_{\text{pulso}}/E_{\text{pulso}}$, $t_{\text{pulso}}/t_{\text{pulso}}$ y $E_{\text{pulso}}/E_{\text{pulso}}$ son significativas con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$). En la Tabla 10 se observan los valores óptimos para t_{pulso} y E_{pulso} que fueron 20 ms y 160 mV, respectivamente.

Tabla 10.

Optimización de los parámetros electroanalíticos por diseño de compuesto central

Parámetro	Valor óptimo
t_{pulso} (ms)	20
E_{pulso} (mV)	160

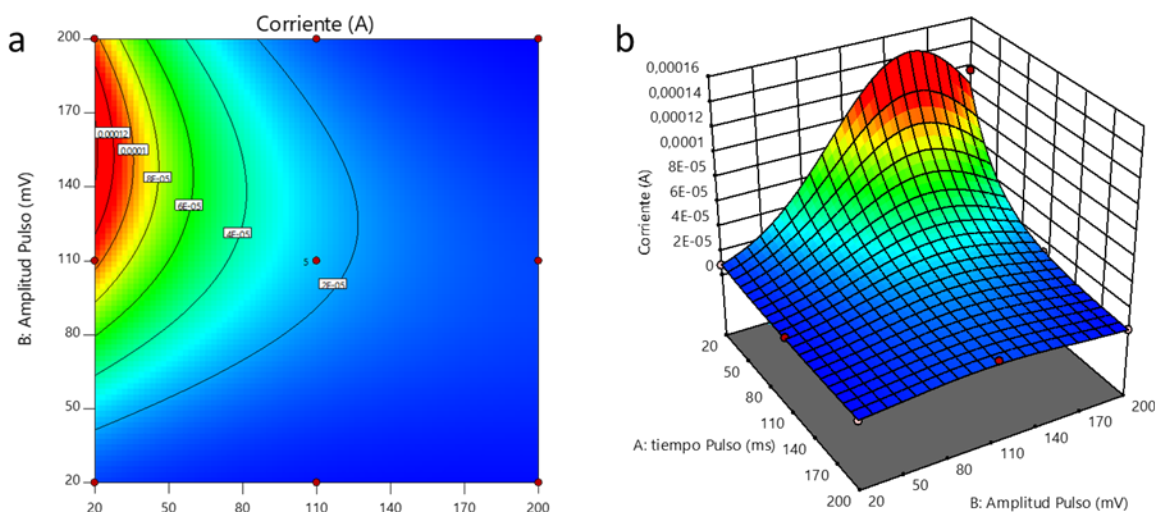
La Figura 7a y 7b se puede observar el diagrama de contorno y la superficie de respuesta para la corriente en función de la interacción $t_{\text{pulso}}/E_{\text{pulso}}$, y confirma los valores óptimos presentados en la Tabla 10. Además, se observa una relación inversa entre t_{pulso} y E_{pulso} . Al incrementar el t_{pulso} y disminuir E_{pulso} la corriente se hace mínima. También se presenta una disminución de la corriente para E_{pulso} superiores a 170 mV y t_{pulso} mayores a 50 ms. La optimización de los parámetros electroanalíticos por diseño de compuesto central se ajusta a la siguiente ecuación:

$$\text{Óptimo} = -10,66 - (1,17 \times A) + 0,5517 \times B - (0,688 \times AB) + 0,3219A^2 - (0,34 \times B^2)$$

Donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales. La anterior ecuación es válida para t_{pulso} entre 20-200 ms y E_{pulso} entre 20-200 mV.

Figura 7.

a) Diagrama de contorno y b) Superficie de respuesta para la corriente en función de t_{pulso} y E_{pulso} .



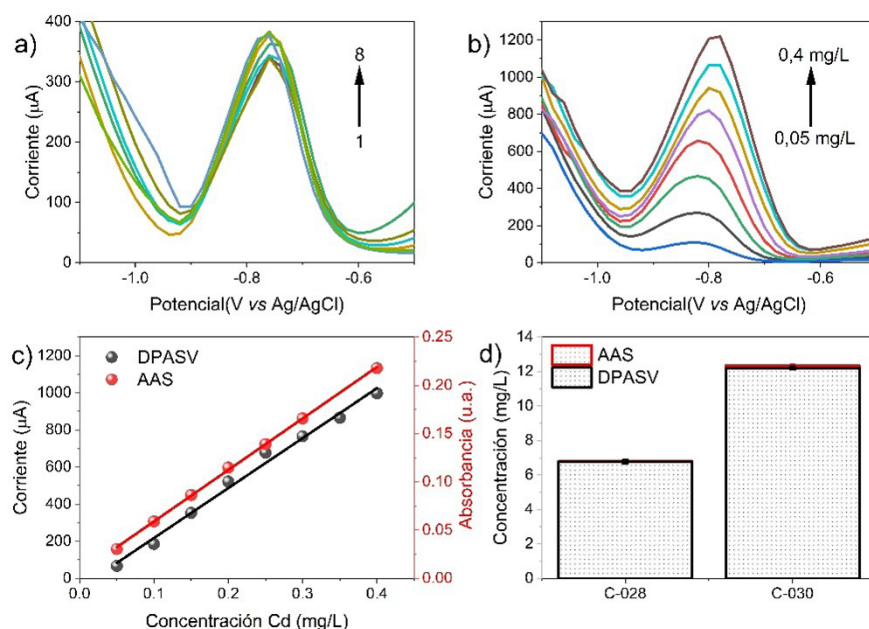
Repetibilidad y curva de calibración

Además, se evaluó la repetibilidad del análisis en las condiciones óptimas, se aplicaron ocho mediciones continuas por DPASV a una solución de 0,5 mg/L de Cd^{2+} + 5,0 mg/L de Bi^{3+} en 0,1 M de HCl (Figura 8a). El valor de desviación estándar relativa (RSD) fue de 7,2%, indicando una repetibilidad aceptable. Posteriormente, se realizó una curva de calibración de Cd^{2+} en el rango de concentraciones de 0,05 a 0,4 mg/L (Figura 8b). La corriente de pico anódico presentó un comportamiento lineal con el incremento de la concentración de Cd^{2+} (Corriente (μA) = 2,690 (mg L⁻¹) - 51,328), con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,989 (Figura 7c). Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron 0,032 y 0,099 mg/L, respectivamente. Finalmente, se realizó el análisis de las semillas de cacao de los clones LUKER 40, ICS y CCN 51, pero no se obtuvo señal analítica para ninguno de los tres clones, posiblemente las muestras presentan una concentración de Cd^{2+} por debajo del LOD. Con el objetivo de corroborar lo anteriormente mencionado, se realizó una curva de calibración en mismo rango de concentraciones de Cd^{2+} por AAS (Figura 8c, rojo). La ecuación lineal fue Absorbancia (u.a.) = 0,5335 (mg L⁻¹) + 0,0056 con R^2 , LOD y LOQ de 0,999; 0,007 y 0,023 mg/L, respectivamente. Sin embargo, tampoco fue posible detectar una señal analítica. Estos resultados se pueden interpretar a partir de las prácticas agrícolas que se han empleado en la parcela “El Limón”, dado que, es mínimo el uso de agroquímicos para el mantenimiento de la plantación de cacao. Además, la zona nunca ha sido empleada para realizar minería o alguna otra actividad antropogénica, que son algunas fuentes de disponibles de cadmio. En este sentido, se adquirió dos muestras de cacao (C-028 y C-030) procedentes del departamento de Santander donde se han reportado 1,8 hasta 74 mg/kg de cadmio en suelo. Las muestras se prepararon y midieron en las mismas condiciones que los clones de la parcela el “El Limón”. La concentración de Cd^{2+} para las muestras C-028 y C-030 fue 6,80 y 12,34 mg/L por AAS, respectivamente. Por otro lado, para DPASV fue 6,77 y 12,21 mg/L para C-028

y C-030, respectivamente. Los resultados obtenidos por AAS y DPASV fueron similares (Figura 8d), indicando que la técnica electroquímica es adecuada para la determinación de cadmio en muestras de cacao.

Figura 8.

a) Repetibilidad. b) DPASV en el rango de 0,05 a 0,4 mg/L de Cd^{2+} + 5,0 mg/L de Bi^{3+} en 0,1 M de HCl. c) Curva de calibración por DPASV y AAS. d) Comparación muestras de cacao de Santander.



Conclusiones

El electrodo de GC presenta características adecuadas para generación de la película de bismuto. El diseño de superficie de respuesta Box Behnken determinó que el orden creciente de influencia en el proceso de optimización de la película de bismuto es $E_{\text{depósito}} > [\text{Bi}^{3+}] / t_{\text{depósito}}$, se obtuvieron como condiciones óptimas un $E_{\text{depósito}}$ de -1100 mV, $[\text{Bi}^{3+}]$ de 5,0 mg/L y $t_{\text{depósito}}$ de 650 s. Para la optimización de parámetros electroanalíticos para cuantificación de Cd a través de un diseño de superficie de respuesta de compuesto central se obtuvo que el t_{pulso} y E_{pulso} son igualmente de relevantes, como parámetros óptimos se obtuvo t_{pulso} de 20 ms y E_{pulso} de 160 mV. Por otro lado, las muestras de cacao (clones LUKER 40, ICS y CCN 51) obtenidas de la parcela "El Limón" de CIMAZ- MACAGUAL no presentaron señal analítica de Cd por DPASV y AAS, debido a las condiciones de cultivo con mínima utilización de agroquímicos. Además, la zona no sea a empleado para ningún tipo de explotación antropogénica. Sin embargo, las muestras obtenidas de Santander (C-028 y C-030) presentaron concentraciones similares por DPASV y AAS, indicando que GC modificado con película de bismuto es adecuada para determinación de Cd en muestras de cacao.

Referencias

- Sousa Filho, H. R., de Jesus, R. M., Bezerra, M. A., Santana, G. M. & de Santana, R. O. History, dissemination, and field control strategies of cocoa witches' broom. *Plant Pathol* 70, 1971–1978 (2021).
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K. & Bashir, K. Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends Food Sci Technol* 66, 108–116 (2017).
- Parra-Paitan, C., zu Ermgassen, E. K. H. J., Meyfroidt, P. & Verburg, P. H. Large gaps in voluntary sustainability commitments covering the global cocoa trade. *Global Environmental Change* 81, 1–15 (2023).
- Cadena de Cacao. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 27 Preprint at [https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2021-03-31 Cifras Sectoriales.pdf](https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2021-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf) (2021).
- Gobernación del Caquetá. Plan de desarrollo departamental 2020 - 2023. Pacto social por el desarrollo de nuestra región. Plan de desarrollo departamental del Caquetá. 1–171 Preprint at (2020).
- Guarin, D. et al. Cadmium contamination in cacao farms of Piura, North Peru: A comprehensive assessment of geogenic and anthropogenic sources and implications for future production. *Environmental Challenges* 1–20 (2023) doi:<https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100765>.
- Kubier, A., Wilkin, R. T. & Pichler, T. Cadmium in soils and groundwater: A review. *Applied Geochemistry* 108, 1–16 (2019).
- Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R. & Sadeghi, M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology* vol. 12 1–19 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972> (2021).
- Liu, X., Cai, Y., Ni, P., Liu, B. & Tang, X. The Effect of Atmospheric Carbon Dioxide Concentration on the Growth and Chlorophyll Fluorescence Characteristics of Hazelnut Leaves under Cadmium Stress. *Forests* 14, 1–16 (2023).
- Haider, F. U. et al. Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Eco-toxicol Environ Saf* 211, 1–22 (2021).
- Waheed, A. et al. Impact of Cadmium Stress on Growth and Physio-Biochemical Attributes of *Eruca sativa* Mill. *Plants* 11, 1–14 (2022).
- Rosales-Huamani, J. A. et al. Study to Determine Levels of Cadmium in Cocoa Crops Applied to Inland Areas of Peru: "The Case of the Campo Verde-Honorio Tournavista

- Corridor". *Agronomy* 10, 1–14 (2020).
- Wade, J. et al. Drivers of cadmium accumulation in *Theobroma cacao* L. beans: A quantitative synthesis of soil-plant relationships across the Cacao Belt. *PLoS One* 17, 1–18 (2022).
- Barati, E. et al. An investigation of zinc isotope fractionation in cacao (*Theobroma cacao* L.) and comparison of zinc and cadmium isotope compositions in hydroponic plant systems under high cadmium stress. *Sci Rep* 13, 1–12 (2023).
- Biswas, A., Pal, S. & Paul, S. Silicon as a powerful element for mitigation of cadmium stress in rice: A review for global food safety. *Plant Stress* 1–20 (2023) doi:<https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100237>.
- Castro-Bedriñana, J. et al. Lead, Cadmium, and Arsenic in Raw Cow's Milk in a Central Andean Area and Risks for the Peruvian Populations. *Toxics* 11, 1–15 (2023).
- Mishra, S., Singh, G., Gupta, A. & Tiwari, R. K. Heavy Metal/Metalloid Contamination: Their Sources in Environment and Accumulation in Food Chain. in *Heavy Metal Toxicity: Environmental Concerns, Remediation and Opportunities* (eds. Singh, R. P., Singh, P. & Srivastava, A.) 19–47 (Springer Nature Singapore, Singapore, 2023). doi:10.1007/978-981-99-0397-9_2.
- Suhani, I., Sahab, S., Srivastava, V. & Singh, R. P. Impact of cadmium pollution on food safety and human health. *Curr Opin Toxicol* 27, 1–7 (2021).
- Ma, Y., Ran, D., Shi, X., Zhao, H. & Liu, Z. Cadmium toxicity: A role in bone cell function and teeth development. *Science of The Total Environment* 769, 1–9 (2021).
- Branca, J. J. V et al. Cadmium-Induced Oxidative Stress: Focus on the Central Nervous System. *Antioxidants* 9, 1–20 (2020).
- Al-Saleh, I. Health Risk Assessment of Trace Metals Through Breast Milk Consumption in Saudi Arabia. *Biol Trace Elem Res* 199, 4535–4545 (2021).
- Ebrahimi, M. et al. Effects of lead and cadmium on the immune system and cancer progression. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* vol. 18 335–343 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00455-2> (2020).
- Reglamento (UE) No 488/2014, Comisión Europea. *EFSA Journal* vol. 9 75–79 (Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 2011).
- Rodríguez Giraldo, Y., Rodríguez Sánchez, E., Torres, L. G., Montenegro, A. C. & Pichimata, M. A. Development of validation methods to determine cadmium in cocoa almond from the beans by ICP-MS and ICP-OES. *Talanta Open* 5, 1–6 (2022).

- Araujo-Abad, S., Tapia, W. & Villamarín-Ortiz, A. Verification of the atomic absorption spectroscopy with graphite furnace analytical method for the quantification of cadmium in cocoa almonds (*Theobroma cacao*). *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* 31, 59–73 (2020).
- Mohamed, R., Zainudin, B. H. & Yaakob, A. S. Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chem* 303, 1–6 (2020).
- Förste, F. et al. Quantitative Analysis and 2D/3D Elemental Imaging of Cocoa Beans Using X-ray Fluorescence Techniques. *Anal Chem* 95, 5627–5634 (2023).
- He, Q. et al. Research on the construction of portable electrochemical sensors for environmental compounds quality monitoring. *Mater Today Adv* 17, 1–17 (2023).
- Baranwal, J., Barse, B., Gatto, G., Broncova, G. & Kumar, A. Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review. *Chemosensors* 10, 1–22 (2022).
- Hassan, M. H., Khan, R. & Andreescu, S. Advances in electrochemical detection methods for measuring contaminants of emerging concerns. *Electrochemical Science Advances* 2, 1–15 (2022).
- Tesfaw, B., Mehretie, S. & Admassie, S. Quantification of lead in cooking utensils and vegetables using square wave anodic stripping voltammetry. *Heliyon* 4, 1–14 (2018).
- Alghamdi, A. H. Applications of stripping voltammetric techniques in food analysis. *Arabian Journal of Chemistry* 3, 1–7 (2010).
- Giacomino, A. et al. Anodic stripping voltammetry with gold electrodes as an alternative method for the routine determination of mercury in fish. Comparison with spectroscopic approaches. *Food Chem* 221, 737–745 (2017).
- Lee Ying-Hui and Hu, C.-C. Mercury Drop Electrodes. in *Encyclopedia of Applied Electrochemistry* (ed. Kreysa Gerhard and Ota, K. and S. R. F.) 1233–1240 (Springer New York, New York, NY, 2014). doi:10.1007/978-1-4419-6996-5_68.
- Wygant, B. R. & Lambert, T. N. Thin Film Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry: A Mini-Review. *Frontiers in Chemistry* vol. 9 1–8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.809535> (2022).
- Economou, A. & Fielden, P. R. Mercury film electrodes: Developments, trends and potentialities for electroanalysis. *Analyst* 2, 814–815 (2003).
- Keramari, V., Karastogianni, S. & Girousi, S. New Prospects in the Electroanalysis of

- Heavy Metal Ions (Cd, Pb, Zn, Cu): Development and Application of Novel Electrode Surfaces. *Methods and Protocols* vol. 6 1–15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/mps6040060> (2023).
- Da Silva Santos, F. et al. Review—Recent Advances of Electrochemical Techniques in Food, Energy, Environment, and Forensic Applications. *ECS Sensors Plus* 1, 1–13 (2022).
- Szpisják-Gulyás, N. et al. Methods for experimental design, central composite design and the Box–Behnken design, to optimise operational parameters: A review. *Acta Alimentaria* vol. 52 Preprint at <https://doi.org/10.1556/066.2023.00235> (2023).
- Zhao, G., Wang, H., Liu, G. & Wang, Z. Box-Behnken response surface design for the optimization of electrochemical detection of cadmium by Square Wave Anodic Stripping Voltammetry on bismuth film/glassy carbon electrode. *Sens Actuators B Chem* 235, (2016).
- Tarley, C. R. T. et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal* vol. 92 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.02.002> (2009).
- Dobrowolska-Iwanek, J. et al. Determination of Essential Minerals and Trace Elements in Edible Sprouts from Different Botanical Families—Application of Chemometric Analysis. *Foods* 11, 1–13 (2022).
- Uskoković, V. A historical review of glassy carbon: Synthesis, structure, properties and applications. *Carbon Trends* 5, 100116 (2021).
- Zamani, M., Klapperich, C. M. & Furst, A. L. Recent advances in gold electrode fabrication for low-resource setting biosensing. *Lab Chip* 23, 1410–1419 (2023).
- Du, X. et al. Preparation of bismuth film-modified gold electrodes for the determination of trace level of heavy metals in vegetables. *Sens Lett* 5, 1–6 (2007).
- Shen, Y., Zhang, H., Cao, H., Wu, L. & Zheng, G. Efficient extraction of bismuth from hydrochloric acid solution by copper powder. *Hydrometallurgy* 189, 1–8 (2019).
- V, C., G., V., M., S., R., H. & K., S. Fabrication of Arsenic (III) Nano Sensor After Optimising by Glassy Carbon Electrode. in 2022 International Conference on Computer, Power and Communications (ICCCP) 179–186 (2022). doi:10.1109/ICCCP55978.2022.10072293.
- Welch, C. M. & Compton, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* vol. 384 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0230-3> (2006).

- Kilani, M. et al. Toward Precision Deposition of Conductive Charge-Transfer Complex Crystals Using Nanoelectrochemistry. *Small Methods* 7, (2023).
- Lee, S., Park, S. K., Choi, E. & Piao, Y. Voltammetric determination of trace heavy metals using an electrochemically deposited graphene/bismuth nanocomposite film-modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 766, (2016).
- Lin, C. H., Li, P. H., Yang, M., Ye, J. J. & Huang, X. J. Metal Replacement Causing Interference in Stripping Analysis of Multiple Heavy Metal Analytes: Kinetic Study on Cd(II) and Cu(II) Electroanalysis via Experiment and Simulation. *Anal Chem* 91, (2019).
- Suárez, L. R., Suárez Salazar, J. C., Casanoves, F. & Ngo Bieng, M. A. Cacao agroforestry systems improve soil fertility: Comparison of soil properties between forest, cacao agroforestry systems, and pasture in the Colombian Amazon. *Agric Ecosyst Environ* 314, 107349 (2021).
- Salazar, J. C. S. et al. Photosynthesis limitations in cacao leaves under different agroforestry systems in the Colombian Amazon. *PLoS One* 13, e0206149 (2018).
- Joya-Barrero, V., Pearse, J. & Huguet, C. Natural and Anthropogenic Sources of Cadmium in Cacao Crop Soils in Santander, Colombia. (2021) doi:10.21203/rs.3.rs-1055771/v1.