



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Determinación de metales pesados en suelos de cultivo y en granos de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) pertenecientes a la zona litoral central del Ecuador

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTOR: Ostz Garry Albán Ávila

TUTOR: Dr.-Ing. Rodny David Peñafiel Ayala

Ambato – Ecuador

Marzo - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr.-Ing. Rodny David Peñafiel Ayala

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de la Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 08 de Febrero de 2023

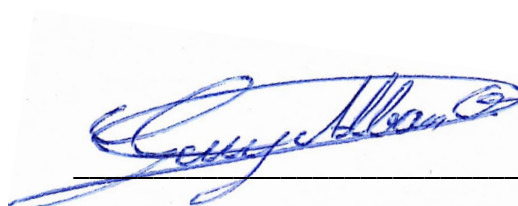
Dr.-Ing. Rodny David Peñafiel Ayala

C.I. 1712283520

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Ostz Garry Albán Ávila, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero en Biotecnología, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Ostz Garry Albán Ávila

C.I. 1206284315

Autor

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidenta del Tribunal

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldás
C.C. 1802706596

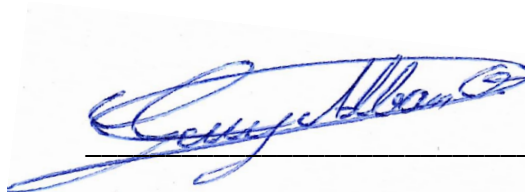
Mg. Daniel Alfonso Cabrera Valle
C.C. 1802561595

Ambato, 07 de marzo de 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Ostz Garry Albán Ávila

C.I. 1206284315

Autor

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por el haberme forjado desde mi niñez, con el apoyo y amor incondicional. Sus palabras, correcciones y oraciones que me ayudaron a llegar seguir mis metas y nunca rendirme.

A la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología como también al proyecto Canje de Deuda Ecuador-España “Fortalecimiento de la unidad operativa de investigación (FITA-UOITA)” por brindarme las herramientas y conocimientos para formarme como ser humano y como profesional. A los docentes que a través de los semestres con sus cátedras me llenaron de conocimiento.

A mi tutor el Dr. Rodny Peñafiel, por compartirme su conocimiento en clases y en todas las etapas de este presente trabajo que me ayudaron a realizar de manera correcta mis actividades. A los docentes parte del miembro de jurado de tesis, por dedicar su tiempo, su análisis y comentarios de mejora para el desarrollo del presente proyecto.

Al Sr. Mario Izurieta, su hija y yerno por abrirme las puertas de la finca cacaotera “La Esperanza” ubicada en el cantón Montalvo, Los Ríos para la realización de toma de muestras. A todos mis amigos que fueron parte de mi formación que juntos nos apoyamos hasta el final de este hermoso camino, quienes con su amistad aportaron a que la consecución de este objetivo sea una experiencia inolvidable.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.1.1. Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	1
1.1.2. Producción de cacao en Ecuador.....	2
1.1.3. Producción de cacao en el cantón Montalvo, Los Ríos	2
1.1.4. Contaminación de metales pesados en agricultura.....	3
1.1.5. Fuentes de metales pesados.....	4
1.1.6. Absorción de metales pesados por las plantas	5
1.1.7. Metales pesados que afectan a los cultivos de cacao	6
1.1.8. Metales pesados en la salud humana.....	8
1.1.9. Método de detección de metales pesados.....	9
1.1.10. Norma ambiental y límites máximos de metales pesados en suelo	11
1.1.11. Normas ambientales y límites máximos de metales en grano de cacao, chocolates y productos derivados de cacao.	11
1.2. Objetivos	14
1.2.1. Objetivo General	14
1.2.2. Objetivos Específicos.....	14
CAPÍTULO II	15

2.	METODOLOGÍA.....	15
2.1.	Materiales.....	15
2.1.1.	Equipos de laboratorio	15
2.1.2.	Instrumentos de laboratorio.....	16
2.1.3.	Reactivos de laboratorio.....	17
2.1.4.	Insumos de laboratorio.....	17
2.1.5.	Materiales de escritorio	18
2.2.	Métodos	18
2.2.1.	Muestras de estudio.....	18
2.2.2.	Tipo de muestreo realizado	19
2.2.3.	Recolección de muestras de suelo.....	21
2.2.4.	Recolección de muestras de mazorcas de cacao	22
2.2.5.	Conservación y transporte de muestras.....	23
2.2.6.	Medición de parámetros fisicoquímicos	23
2.2.7.	Digestión de las muestras de suelo y granos de cacao	25
2.2.8.	Determinación de metales por espectrofotometría de absorción atómica 26	
2.2.9.	Análisis estadístico.....	28
2.2.10.	Análisis de Correlación de Pearson.....	28
	CAPÍTULO III.....	29
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1.	Análisis y discusión de los resultados	29
3.1.1.	Parámetros fisicoquímicos en muestras de suelo	29
3.1.2.	Parámetros fisicoquímicos en muestras de grano de cacao.	32
3.1.3.	Determinación de cadmio en muestras de suelo y granos de cacao.....	34
3.1.4.	Determinación de plomo en muestras de suelo y granos de cacao	36
3.1.5.	Determinación de níquel en muestras de suelo y granos de cacao	38

3.1.6.	Determinación de arsénico en muestras de suelo y granos de cacao ...	40
3.1.7.	Correlación entre parámetros fisicoquímicos del suelo y concentraciones de metales pesados en muestras de suelo y grano de cacao.....	42
3.2.	Verificación de Hipótesis	45
CAPÍTULO IV	46
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
4.1.	Conclusiones.....	46
4.2.	Recomendaciones.....	48
MATERIALES DE REFERENCIA	49
Bibliografía	49
Anexos	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Fuentes antropogénicas de metales pesados en suelos agrícolas.	4
Tabla 2.	Forma tóxica de Cd y sus efectos tóxicos en el suelo y las plantas.	6
Tabla 3.	Forma tóxica de Pb y sus efectos tóxicos en el suelo y las plantas.	7
Tabla 4.	Forma tóxica de Ni y sus efectos tóxicos en el suelo y las plantas.	7
Tabla 5.	Forma tóxica de As y sus efectos tóxicos en el suelo y las plantas.	8
Tabla 6.	Toxicidad del cadmio, plomo, níquel y arsénico en la salud humana.	9
Tabla 7.	Criterios de calidad de suelo agrícolas descritos en el TULSMA.	11
Tabla 8.	Límites máximos permisibles (LMP) de Cd establecidos por la Comisión Europea en el chocolate y productos del cacao.	12
Tabla 9.	Límites máximos permisibles (LMP) de Cd establecidos Proposición 65 del Acuerdo Industrial (San Pin 2.2-1078-01).	12
Tabla 10.	Concentraciones permisibles de los metales Pb, Ni y As en granos de cacao, derivados y alimentos según normas vigentes.	13
Tabla 11.	Equipos de laboratorio.	15
Tabla 12.	Instrumentos de laboratorio.	16
Tabla 13.	Reactivos de laboratorio.	17
Tabla 14.	Insumos de laboratorio.	17
Tabla 15.	Materiales de escritorio.	18
Tabla 16.	Coordenadas UTM de los puntos de muestreo generados sistemas de información geográfica (ArcGIS).	20
Tabla 17.	Estándares monoelementales (AccuStandar) de 1000 µg/L.	26
Tabla 18.	Rango de la recta de calibración y límites de detección.	27
Tabla 19.	Parámetros fisicoquímicos de muestras de suelos de cultivo en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Ríos.	29
Tabla 20.	Parámetros fisicoquímicos en muestras de granos cacao en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.	32

Tabla 21. Concentración de metales pesados en muestras de suelos de cultivo en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.	34
Tabla 22. Concentración de metales pesados en muestras de granos de cacao de plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.	38
Tabla 23. Matriz de correlación de parámetros fisicoquímicos del suelo y concentraciones de metales pesados en el suelo de cultivo y granos de cacao.	42
Tabla 24. Rango de interpretación de los coeficientes de correlación de Pearson. .	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras 1. Absorción de metales pesados en plantas de cacao	5
Figuras 2. Diagrama de los componentes básicos de EAA	10
Figuras 3. Ubicación geográfica de finca cacaotera a muestrear	19
Figuras 4. Esquema de distribución zigzag que se utilizó en la toma de submuestras en 5 puntos seleccionados	22
Figuras 5. Concentración de Cd en muestras de suelos del cultivo y en granos de cacao de plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos	35
Figuras 6. Concentración de Pb en muestras de suelos del cultivo y en granos de cacao de plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos	37
Figuras 7. Concentración de Ni en muestras de suelos del cultivo y en granos de cacao en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos	39
Figuras 8. Concentración de As en muestras de suelos del cultivo y en granos de cacao en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos	41
Figuras 9. Coeficiente de correlación de Pearson entre el pH y concentración de níquel en el suelo.....	43
Figuras 10. Coeficiente de correlación de Pearson entre las concentraciones de Cd en suelo y granos de cacao.....	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Muestreo y medición de parámetros fisicoquímicos en muestras de suelo de plantación de cacaotera	62
Anexo 2. Muestreo y medición de parámetros fisicoquímicos en muestras de granos de cacao de plantación de cacaotera.....	63
Anexo 3. Proceso de digestión acida y medición de concentraciones de metales por medio del equipo de EAA con horno de grafito	64
Anexo 4. Parámetros para la elaboración de la curva de calibración de Cd y Pb.	65
Anexo 5. Parámetros para la elaboración de la curva de calibración de Ni y As.....	66
Anexo 6. Cadena de custodia en el muestreo de suelo de cultivo de cacao.....	67
Anexo 7. Cadena de custodia en el muestreo de mazorcas de cacao.....	68

RESUMEN

Los metales pesados como el cadmio (Cd), plomo (Pb), níquel (Ni) y arsénico (As) son peligrosos hacia el medio ambiente y la salud humana; investigaciones recientes han llegado a la conclusión de los riesgos a la salud por la ingesta de alimentos contaminados. Este estudio utiliza un enfoque general para determinar las concentraciones de Cd, Pb, Ni y As en el suelo de cultivo, y en granos de cacao pertenecientes a plantación cacaotera del Cantón Montalvo, provincia Los Ríos. Tiene como objetivo determinar si las concentraciones de metales sobrepasan los límites máximos permisibles (LMP) de la norma ambiental y de legislaciones internacionales hacia el cacao y sus derivados. Como resultados, el As y Cd presentes en el suelo de cultivo superaron los LMP de 19 y 0.5 miligramo por kilogramo respectivamente; con concentraciones medias de 13.80 miligramos por kilogramo de As y 0.69 miligramos por kilogramo de Cd. Mientras que el As, Ni y Cd presentes en granos de cacao superaron los LMP de 0.5, 1 y de 0.1 a 0.8 miligramos por kilogramo respectivamente; con concentraciones medias de 3.67 miligramos por kilogramo de As, 3.21 miligramos por kilogramo de Ni y 1.48 miligramos por kilogramo de Cd. Por lo que es necesario desarrollar técnicas de remediación exitosas en el suelo de cultivo mientras que en granos de cacao estos metales deben ser precautelados por autoridades de salud pública en el consumo de productos derivados del cacao.

Palabras Claves: gestión ambiental, gestión de residuos, cadmio, plomo, níquel, arsénico, suelo de cultivo, grano de cacao, metales pesados.

ABSTRACT

Heavy metals such as cadmium (Cd), lead (Pb), nickel (Ni), and arsenic (As) are dangerous to the environment and human health. Recent research has concluded that they are related to health risks caused by the ingestion of contaminated food. This study uses a general approach to determine the concentrations of Cd, Pb, Ni, and As in the cultivated soil and in cocoa beans, which grow in a cocoa plantation in Montalvo - Los Ríos. The main purpose of this study is to determine if the concentrations of heavy metal exceed the maximum permissible limits (MPL) established by environmental standards and international legislation for cocoa and its derivatives. As a result, As and Cd present in the cultivated soil exceeded the MPL of 19 and 0.5 milligrams per kilogram respectively, with mean concentrations of 13.80 milligrams per kilogram of As and 0.69 milligrams per kilogram of Cd. As, Ni and Cd present in cocoa beans exceeded the MPL of 0.5, 1 and 0.1 to 0.8 milligrams per kilogram respectively, with mean concentrations of 3.67 milligrams per kilogram of As, 3.21 milligrams per kilogram of Ni and 1.48 milligrams per kilogram of Cd. Overall, it is necessary to develop successful remediation techniques in the cultivated soil, meanwhile, in cocoa beans, these metals should be considered by public health authorities in the intake of products derived from cocoa.

Keywords: environmental management, waste management, cadmium, lead, nickel, arsenic, crop soil, cocoa bean, heavy metals.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Cacao (*Theobroma cacao* L.)

El cacao es un árbol perteneciente a la familia *Sterculiaceae*, nativo de las regiones húmedas tropicales de América central y de la selva Amazónica de América del Sur (Jaimez et al., 2022). El mismo llega a medir aproximadamente de 4 a 8 m de alto, con ramas en verticilos, brotaciones verticales, hojas grandes de 12 a 60 cm de largo y con un fruto característico de color amarillo a rojo, denominado “vaina de cacao” el cual produce aproximadamente 35-50 semillas de color marrón rodeadas de un mucilago blanco dulce (Gardea et al., 2017).

Las semillas de cacao son la principal materia prima de interés para la industria de la chocolatería, un placer apreciado en todo el mundo. De igual manera, a partir de las semillas fermentadas y secas se producen diferentes productos de interés como el licor de cacao, manteca de cacao, polvo de cacao, entre otros (Caligiani et al., 2016). Además, en los últimos años también se utilizan en la industria cosmética o farmacéutica, con un interés creciente en los últimos años como fuente de compuestos bioactivos, en especial polifenoles (Indiarito et al., 2021). El cultivo de cacao está relacionado con condiciones edafoclimáticas adecuadas principalmente en la región trópica a 20° Norte y 20° Sur de la línea ecuatorial, con una temperatura entre los 22 y 32 °C, altitud menor al 1000 msnm, un suministro hídrico entre 1200 y 2500 mm/anales y una humedad relativa del 80 %. El tipo de suelo para el cultivo idóneo son francos limosos y francos arenosos a un pH en el rango de 6.0 a 7.5 (Rodríguez-Velázquez et al., 2022).

1.1.2. Producción de cacao en Ecuador

Históricamente el país ha sido un productor y exportador de cacao desde sus comienzos a mediados del siglo XXI, acaparando el 6,8% del total de las exportaciones globales en el año 2019, ubicándose en el tercer lugar de productores a nivel mundial después de países africanos. En consecuencia, este forma parte importante de la economía ecuatoriana gracias a los ingresos en divisas y aporte al PIB nacional que beneficia a más de 400.000 familias (**Arosemena, 2021**). Ecuador por sus condiciones edafoclimáticas es un excelente productor de cacao. Cubre actualmente el 63 % de la producción mundial de cacao fino de aroma (**Abad et al., 2020**). El cacao se cultiva en las regiones del Litoral y la Amazonía, ocupando alrededor de 601.000 hectáreas. Las principales provincias productoras y extensas de cultivo en el país son: Los Ríos, Guayas, Manabí, Esmeraldas, El Oro y provincias de la región Amazónica como Napo y Orellana. Especialmente en el país se cultivan dos variedades de cacao: CCN-51 y Nacional fino de aroma conocido como “Arriba” (**Guerrero, 2019**).

El cacao ecuatoriano desde el 2021 tiene como principal destino a los países de Estados Unidos, Países Bajos, México, Indonesia, Alemania, China, Bélgica, Japón y Malasia (**García-Briones et al., 2021**). En el año 2021, las exportaciones de cacao y productos semielaborados llegaron a USD 940 millones. Por otro lado, en el primer trimestre del 2022, se exportaron alrededor de 83.81 - 74.12 toneladas en grano y 93.68 toneladas de productos semielaborados, generando USD 211.7 millones; previendo incrementar un 4% del volumen de exportaciones de cacao (**Arosemena, 2021**).

1.1.3. Producción de cacao en el cantón Montalvo, Los Ríos

La producción del cacao en la costa del Ecuador, particularmente la Provincia de Los Ríos, es la que más aporta con 81.578 toneladas de cacao a nivel nacional. En la provincia más de un 85 % de su superficie es destinada a cultivos permanentes de cacao. El cantón Montalvo cuenta con 18.000 ha en fincas con cultivos de cacao de la variedad mayoritaria CCN-51 (**Jimenez et al., 2018**). La producción se encuentra a nivel familiar y campesina, posteriormente llegan a contactar con comerciantes

intermediarios que llevan el producto a empresas exportadoras de cacao (**Paredes, 2022**). Para ello, campesinos y agricultores intentan mantener buenas prácticas agrícolas (BPA). Sin embargo, existe un uso indiscriminado de insecticidas y diversos productos químicos en contra de las enfermedades de moniliasis (*Moniliophthora roreri*), mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) y escoba de bruja (*Crinipellis pernicioso*), conllevando a la pérdida de calidad del cacao en las plantaciones (**Velasquéz, 2020**).

1.1.4. Contaminación de metales pesados en agricultura

Debido al enorme desarrollo industrial, el medio ambiente está siendo afectado cada vez más por contaminantes, los cuales pueden llegar a originarse a partir de fuentes antropológicas, así como de naturales. Por lo general, estas sustancias incluyen metales pesados, los mismos provocan riesgos y peligros al agua, aire y suelo (**Alí et al., 2019**). Naturalmente, los metales pesados son metales con un alto peso atómico y una densidad superior a 5 g/cm^3 (**Zhang et al., 2019**). En bajas concentraciones, ciertos metales pesados, como hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu) y manganeso (Mn), son esenciales para la salud humana y crecimiento en plantas (**Okereafor et al., 2020**). Otros en cambio no cumplen ninguna función biológica como el arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb), talio (Tl), vanadio (V) y mercurio (Hg) que entrar en contacto con el cuerpo humano y plantas, se convierten en agentes tóxicos.

Los metales pesados surgen principalmente en el sector agrícola por medio del uso de fertilizantes, pesticidas, estiércol de ganado y aguas residuales. Recientemente, el riesgo de contaminación por metales pesados ha aumentado rápidamente y ha creado preocupación, al acumularse en el suelo y en las plantas (**Alengebawy et al., 2021**). Por lo cual, el problema de la contaminación por metales pesados se ha vuelto urgente y necesita soluciones prácticas y radicales para reducir sus peligros.

1.1.5. Fuentes de metales pesados

Las rocas ígneas y sedimentarias son fuente principal de metales pesados de origen natural. Entre ellas se consideran el basalto, el granito, lutitas y areniscas. Además, la formación del suelo también se considera como una de las principales razones de la acumulación de metales pesados (Alí et al., 2019). La agricultura, la minería y el problema de las aguas residuales se consideran como fuentes antropogénicas debido a que estas fuentes elevan la concentración de metales pesados contaminan el ecosistema, por ejemplo, la fundición en metalurgia da la liberación de Cu, Zn y As; insecticidas que contribuyen a la liberación de As y la liberación de gases del tubo escape de los automóviles que liberan Pb (Okereafor et al., 2020).

Tabla 1.

Fuentes antropogénicas de metales pesados en suelos agrícolas.

Fuentes	Influencia en los metales pesados del suelo	Referencias
Fertilizantes	Los mismos son fuentes de metales pesados en el suelo, debido que su síntesis se basa en el fósforo. Se ha demostrado que los fertilizantes de fósforo producen rocas de fosfato, que desempeñan un papel importante en la inmovilización de metales por precipitación, como fosfatos metálicos en el suelo.	(Vanderschuer en et al., 2021)
Aguas Residuales	La presencia de metales pesados en las aguas residuales va en aumento con el crecimiento de la industria de las baterías, industria minera, procesos de enjuague de metales, industria del curtido, industria textil, petroquímica, entre otras.	(Vanisree et al., 2022).
Pesticidas	Sustancias tóxicas o una mezcla de sustancias que se sintetizan de química con altos contenidos de As, Co, Cr, Ni y Pb superiores a los admisibles en el agua.	(Alengebawy et al., 2021).

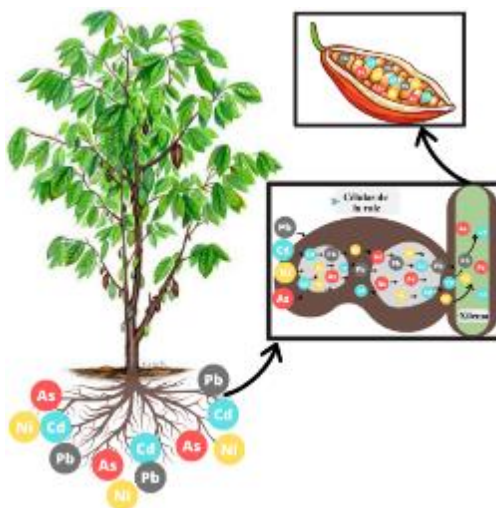
Fuentes	Influencia en los metales pesados del suelo	Referencias
	Estos son ampliamente utilizados para controlar malezas dañinas (herbicidas), hongos (fungicidas), bacterias (bactericidas) e infestaciones de insectos (insecticidas).	(Okereafor et al., 2020)

1.1.6. Absorción de metales pesados por las plantas

Los metales entran en las plantas desde el suelo a través de la raíz. En general, la mayoría de los metales pesados son poco solubles y están disponibles para la absorción por parte de las plantas. A pesar de la alta concentración de metales pesados en el suelo, solo una pequeña fracción de estos metales es fitodisponible (Alí et al., 2019). Por otro lado, la absorción de metales se da por varios procesos, como se demuestra en la *Figura 1*.

Figuras 1.

Absorción de metales pesados en plantas de cacao.



Después de desorción del metal de las partículas del suelo la fracción se absorbe en la superficie de la raíz, después el metal biodisponible se desplaza a través de la membrana celular hacia las células de la raíz. La fracción del metal absorbido en las raíces se inmoviliza en la vacuola, luego atraviesa las membranas celulares hacia el tejido vascular de la raíz motivado por la transpiración, por medio del xilema.

Finalmente, el metal se dirige a los tejidos aéreos, acumulándose en distintos órganos (Jan & Parray, 2016).

1.1.7. Metales pesados que afectan a los cultivos de cacao

1.1.7.1. Cadmio

El Cd se encuentra en el medio ambiente en pequeñas cantidades y se mueve fácilmente en el suelo porque es soluble en agua, es considerado el más tóxico para las plantas debido a que provoca cambios fisiológicos, químicos y estructurales. Una ligera acidez y la presencia de zinc o fosfatos suelen mejorar la absorción de este elemento por parte de la planta (Oumenskou et al., 2018).

Tabla 2.

Forma tóxica de Cd y sus efectos tóxicos en el suelo y las plantas.

Metal pesado	Forma toxica	Efectos tóxicos			Referencia	
		Suelo	Planta			
Cd	Cd ²⁺		Translocación	de	(Zulfiqar et al., 2022).	
		Eliminación	de	nutrientes y agua.		
		microbiota.	Aumento	del		daño
		Absorción	de	oxidativo.		
		materia orgánica.	Interrupción	del		
Cambio	en	las	metabolismo.			
propiedades			Inhibición	de	la	
fisicoquímicas.			morfología	y		
			fisiología.			

1.1.7.2. Plomo

Pb es un metal pesado altamente nocivo y no desintegrativo que constituye el 0.002% de la corteza terrestre. Se produce en forma gaseosa o líquida, sus vapores de se mezclan con el agua de lluvia y se dirigen al suelo. (Borgulat et al., 2021).

Tabla 3.*Forma tóxica de Pb y sus efectos tóxicos en el suelo y las plantas.*

Metal pesado	Forma toxica	Efectos tóxicos		Referencia
		Suelo	Planta	
Pb	Pb ²⁺	Acidificación del pH. Afectación en la absorción. Reducción de fertilidad.	Estrés oxidativo daña el ADN. Disminución del contenido de clorofila. Retraso en el crecimiento del follaje.	(Lan et al., 2020).

1.1.7.3. Níquel

Ni es un componente natural del agua y del suelo. Se considera micronutriente esencial para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Sin embargo, altas concentraciones lo vuelven tóxico para plantas. En la naturaleza, el Ni se presenta principalmente en forma de níquel (Ni²⁺), mientras que en el suelo está presente en la forma de [Ni(H₂O)₆]²⁺ (Kumar et al., 2017).

Tabla 4.*Forma tóxica de Ni y sus efectos tóxicos en el suelo y las plantas.*

Metal pesado	Forma toxica	Efectos tóxicos		Referencia
		Suelo	Planta	
Ni	Ni ²⁺	Acidificación el pH. Disminución de niveles de hierro y manganeso. Reducción de fertilidad.	Generación de estrés oxidativo. Inhibición de germinación. Disminución de fotosintética.	(Hassan et al., 2019).

1.1.7.4. Arsénico

El As es el elemento tóxico más ampliamente encontrado en el medio ambiente, puede existir como especie inorgánica u orgánica: arseniato (AsV) y arsenito (AsIII). Las especies orgánicas se encuentran en bajas concentraciones en los suelos, mientras que las formas inorgánicas de arsénico son más abundantes (Martinez et al., 2021).

Tabla 5.

Forma tóxica de As y sus efectos tóxicos en el suelo y las plantas.

Metal pesado	Forma toxica	Efectos tóxicos		Referencia
		Suelo	Planta	
As	AsV	Acidificación del pH. Disminución niveles de Fe, Al y Mn.	Inhibición del crecimiento en planta.	(Zhang et al., 2021)
	AsIII	Eliminación de microbiota.	Pérdida de clorofila.	

1.1.8. Metales pesados en la salud humana

El Cd, Pb, Ni y As en la exposición dietética a largo plazos de niños y adultos producen graves afectaciones a la salud al ser consumidos por productos alimenticios contaminados. Las afectaciones de estos metales en la salud humana se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 6.*Toxicidad del cadmio, plomo, níquel y arsénico en la salud humana.*

Metal	Afectaciones a la Salud	Órganos afectados	Mecanismo de toxicidad	Referencia
Cd	Carcinógeno - Grupo 1 Proteinuria Osteoporosis Cálculos renales	Riñón Próstata	Proteínas supresoras de tumores e interrupción en reparación ADN.	(Genchi et al., 2020)
Pb	Cancerígeno - Grupo 2A Anemia Hipertensión	Nervio	Interrupción en reparación ADN y producción de especies reactivas (ROS).	
Ni	Carcinógeno - Grupo 2A Daño Pulmonar Dermatitis alérgica	Pulmones Piel	Metilación del ADN y modificaciones de las histonas.	(ATSDR, 2021)
As	Carcinógeno - Grupo 1 Cardiovascular Diabetes Queratosis	Gastrointestinal	Generación de polimorfismos y metilación del ADN.	

1.1.9. Método de detección de metales pesados

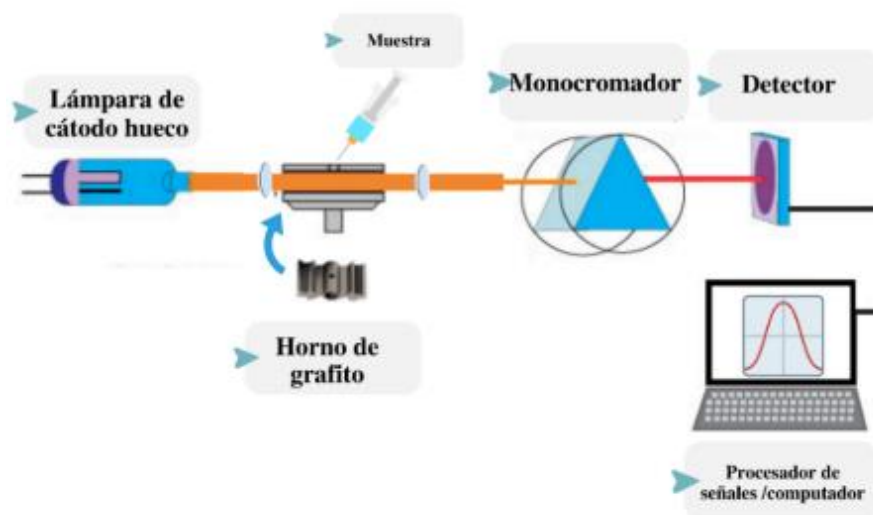
La espectrometría de absorción atómica permite detectar y analizar la concentración de la mayoría de los metales pesados. En la espectrofotometría de absorción atómica se emplean dos medios para convertir la muestra, en átomos libres, siendo estos la llama y el calentamiento electrotérmico en horno de grafito (**Arjomandi & Shirkhanloo, 2019**).

1.1.9.1. Absorción atómica con horno de grafito

El principio básico de la espectrometría de absorción atómica con horno de grafito se realiza en tres fases. Primeramente, se introduce una muestra en el horno de grafito, donde la muestra se seca a una temperatura aproximada de 110 °C. En la segunda fase, la materia orgánica se volatiliza en CO₂ y H₂O a una temperatura de hasta 1200 °C. En la última fase, la temperatura crece exponencialmente a un rango de 2000 – 3000 °C donde el metal se atomiza creando una nube de vapor atómico atrapada en un tubo de grafito. El calentamiento debe realizarse en las condiciones que se adapten al elemento y composición de la muestra (Leclercq et al., 2015).

Figuras 2.

Diagrama de los componentes básicos de EAA con horno de grafito.



La medición de la absorbancia de los átomos del metal se efectúa mediante el uso de una lámpara de cátodo hueco. La luz que produce la lámpara es emitida por átomos excitados del mismo metal que se requiere determinar, por lo que la energía de radiación corresponde directamente a la longitud de onda específica absorbida por el metal atomizado (Arjomandi & Shirkanloo, 2019). El método emplea un monocromador entre la muestra y el detector para reducir interferencias como se observa en la **Figura 2**. Finalmente, el detector mide la intensidad del haz de luz y la convierte en datos de absorción que se muestran en una pantalla de lectura.

1.1.10. Norma ambiental y límites máximos de metales pesados en suelo

El país se basa actualmente en la norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados, presente en el Anexo 2, Libro VI de la Calidad Ambiental del texto unificado de legislación secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA). Esta norma determina los criterios de calidad que el suelo agrícola debe cumplir en torno a las concentraciones de metales pesados para una adecuada calidad ambiental (**Ministerio del Ambiente, 2015**).

Tabla 7.

Criterios de calidad de suelo agrícolas descritos en el TULSMA.

Metal	Límite Máximo de Concentración	Unidad en Peso Seco
Cd	0.5	
As	12	mg·kg ⁻¹
Pb	19	
Ni	19	

1.1.11. Normas ambientales y límites máximos de metales en grano de cacao, chocolates y productos derivados de cacao.

El Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos (CCCF), estableció Normas y elabora códigos de prácticas relacionados con los contaminantes de los alimentos, incluidos el Pb y el Cd. Desde el año 2019 entró en vigor el reglamento 488/2014 de la Unión Europea, donde se estableció los niveles admitidos de Cd para chocolates y cacao en polvo, como se detalla en la **Tabla 7**. Los productos de cacao y chocolate que no cumplen con esta norma se les niega el acceso a los mercados europeos (**The European Commission, 2014**).

Tabla 8.

Límites máximos permisibles (LMP) de Cd establecidos por la Comisión Europea en el chocolate y productos del cacao.

Categorías de alimentos de la Comisión Europea	Comisión Europea (LMP) (mg·kg ⁻¹)
≤30% de sólidos secos totales de cacao	0.10
de ≥30 a <50% de sólidos secos totales de cacao	0.30
≥50% de sólidos secos totales de cacao	0.80
Cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final consumidor final (chocolate para beber)	0.60

De igual manera, en Estados Unidos estableció límites máximos para el Cd en productos de chocolate bajo la Propuesta de Acuerdo Industrial 65 vigente en el 2018, como se detalla en la **Tabla 8**. Sin embargo, los productos que superen los límites serán etiquetados con advertencia para su venta (Meter et al., 2019).

Tabla 9.

Límites máximos permisibles (LMP) de Cd establecidos Proposición 65 del Acuerdo Industrial (San Pin 2.2-1078-01).

% de cacao en productos de chocolate	LMP de Cd (mg·kg ⁻¹)	
	2018-2025	2025
< 65 %	0.40	0.32
65 - 95 %	0.45	0.40
≥ 95%	0.96	0.80

Además, varios países fuera de la Unión Europea (UE) dentro de los cuales Ecuador exporta cacao como lo son: México, Estados Unidos, China, Indonesia, entre otros.

Han establecidos límites de metales pesados en sus alimentos y principales derivados de cacao, como se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 10.

Concentraciones permisibles de los metales Pb, Ni y As en granos de cacao, derivados y alimentos según normas vigentes.

Metal	LMP mg·kg⁻¹	Norma	Referencia
Pb	1	NTE INEN 621:2010	(Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, 2010)
	0.5	Norma para Contaminantes de los Alimentos (GB 2762-2017) – China.	(USDA Foreign Agricultural Service, 2018)
Ni	1	Norma para Contaminantes de los Alimentos (GB 2762-2017) – China.	(USDA Foreign Agricultural Service, 2018)
		Norma para Contaminantes de los Alimentos (GB 2762-2017) – China.	(USDA Foreign Agricultural Service, 2018)
As	0.5	NTE INEN 621:2010	(Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, 2010)
		Norma Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2013.	(Diario Oficial de la Federación México, 2013)

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Determinar el contenido de metales pesados en los suelos del cultivo y en granos de plantación de cacao en el sector San Jacinto del cantón Montalvo de la provincia de Los Ríos perteneciente a la zona litoral central del Ecuador.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los suelos del cultivo y granos de plantación de cacao.
- Cuantificar cadmio, plomo, níquel y arsénico presente en muestras de suelos del cultivo y en granos de plantaciones de cacao por medio de espectrofotometría de Absorción Atómica.
- Comparar el contenido de cadmio, plomo, níquel y arsénico presente en suelo y granos de cacao con las normas ambientales y límites máximos establecidos por la legislación vigente

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Equipos de laboratorio

Tabla 11.

Equipos de laboratorio

Detalle	Cantidad
Medidor de pH <i>Thermo Fisher Scientific</i>	1
Medidor Multiparámetro Impermeable <i>HANNA- HI9829</i>	1
Nevera LG - Inverter <i>GS65MSP1 (4° C)</i>	1
Estufa <i>BINDER</i>	1
Balanza analítica <i>RADWAG</i>	1
Mufla de Cerámica <i>BIOBASE</i>	1
Sistema de digestión por microondas <i>ETHOS UP MILESTONE</i>	1
Campana de extracción de gases <i>Novachem</i>	1
Espectrofotómetro de Absorción Atómica <i>PG INSTRUMENTS AA500</i>	1
Purificador de agua - <i>Thermo Scientific</i>	1
Micropipeta <i>SPINREACT</i> de 100-1000 μL	1

2.1.2. Instrumentos de laboratorio

Tabla 12.

Instrumentos de laboratorio.

Detalle	Cantidad
Puntas de Micropipeta de 1000 μ L	1
Pipetas graduadas de 10 y 25 mL	3
Propipeta	2
Balón de aforo de 100 mL	10
Balón de Aforo 1 L	2
Varilla de Agitación	2
Vaso de precipitación de 100 mL	3
Vaso de precipitación de 250 mL	5
Mortero	1
Vaso de digestión TFM (teflón)	12
Crisol	15
Jeringa	6
Filtro de Jeringa 0.4 mm	50
Probeta 50 mL	1
Viales de plástico 2 mL	50
Desecador	1
Espátula	2
Tamiz 0.5 mm	1
Botella Ámbar 1 L	4
Botella Ámbar 250 mL	30

2.1.3. Reactivos de laboratorio

Tabla 13.

Reactivos de laboratorio.

Detalle	Cantidad
Ácido nítrico (HNO ₃) 65 % - Merck Millipore	110 mL
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) 30 % - Merck Millipore	30 mL
Argón 5.0, pureza: > 99.99 % - Linde	1 cilindro
Estándar Cd (1000 µg/L) - AccuStandart, New Haven, USA	2 mL
Estándar de Pb (1000 µg/L) - AccuStandart, New Haven, USA	2 mL
Estándar de Ni (1000 µg/L) - AccuStandart, New Haven, USA	2 mL
Estándar As (1000 µg/L) - AccuStandart, New Haven, USA	2 mL
Agua destilada	7 L
Kit de solución calibradora de pH: 4, 7 y 10	1 kit

2.1.4. Insumos de laboratorio

Tabla 14.

Insumos de laboratorio.

Detalle	Cantidad
Guantes de nitrilo	1 paquete
Papel Aluminio	1 rollo
Envases estériles de polietileno 125 mL	15 unidades
Parafilm	1 rollo

Detalle	Cantidad
Alcohol antiséptico	1 frasco
Papel absorbente	2 rollos
Envases de polietileno con boca ancha de tapa rosca	15 unidades
Fundas herméticas de polipropileno	15 unidades
Barreno	1 unidad
Pala pequeña	1 unidad
Balde industrial de plástico 10 L	2 unidades
Cinta adhesiva	1 unidad

2.1.5. Materiales de escritorio

Tabla 15.

Materiales de escritorio.

Detalle	Cantidad
Computadora Portátil	1 unidad
Calculadora	1 unidad
Esferos y lápices	5 unidades
Rotuladores	2 unidades
Cuaderno	1 unidad
Etiquetas	1 paquete

2.2. Métodos

2.2.1. Muestras de estudio

Las muestras de suelo y cacao se recolectaron de manera puntual correspondientes al temporal de estación seca en la Costa Ecuatoriana en el mes de octubre. Las muestras

provinieron de la plantación de cultivo de cacao en la variedad CCN-51, de aproximadamente 19.800 m² pertenecientes a la finca “La Esperanza” ubicada en el sector San Jacinto del cantón Montalvo en la provincia de Los Ríos **Figura 3**, correspondiente a la zona litoral central del Ecuador delimitada. Se tomó a consideración la limitante en costos y recursos que se emplearon en la presente investigación.

Figuras 3.

Ubicación Geográfica de finca cacaotera a muestrear.



Nota. Imagen satelital obtenida de Copernicus Sentinel data 2023.

2.2.2. Tipo de muestreo realizado

El muestreo se desarrolló con base a lo descrito por **Lawrence et al.(2020)**. Inicialmente, se analizó el pH y salinidad del suelo por medio de un muestreo sistemático en cuadrícula, donde el área total de estudio se subdividió en cuadrículas de aproximadamente 30 m x 30 m correspondiente a la plantación de cacao. Los puntos de muestreo se generaron previamente a través del sistema de información geográfica

(ArcGIS), que produjo las coordenadas UTM, ubicándose en la intersección de cada cuadrícula obteniendo un número total de 10 puntos de muestreo como se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 16.

Coordenadas UTM de los puntos de muestreo generados sistemas de información geográfica (ArcGIS).

Puntos	Este (UTMX)	Norte (UTMY)	Zona	Hemisferio
1	692901.9	9801669.3		
2	692911.2	9801696.9		
3	692966.8	9801647.7		
4	692976.1	9801690.7		
5	692985.4	9801724.5		
6	692966.8	9801650.8	17	Sur
7	693022.5	9801666.1		
8	693019.4	9801669.1		
9	693034.9	9801712.1		
10	693027.8	9801685.2		

La medición de pH y salinidad se basó en el protocolo descrito por **García & Valdéz (2019)**, en el cual se agregó 200 g de suelo en 500 mL de agua destilada relación 1:2.5. agitándose durante 10 min y se dejó en reposo 20 min. Posteriormente, se insertó el medidor multiparamétrico impermeable HANNA- HI9829 para medir el pH y conductividad en la mezcla, realizándose la lectura correspondiente por triplicado mientras las partículas del suelo se mantenían suspendidas en la solución.

Este equipo fue previamente calibrado días antes de empezar las mediciones con sus respectivos estándares. Después, se continuó la selección 5 puntos de muestreo que presentaron en el suelo un valor de pH ácido entre el rango de 5.1 – 6.5. Finalmente,

alrededor de cada punto seleccionado (5 puntos) se delimitó una parcela cuadrangular de 30 m x 30 m.

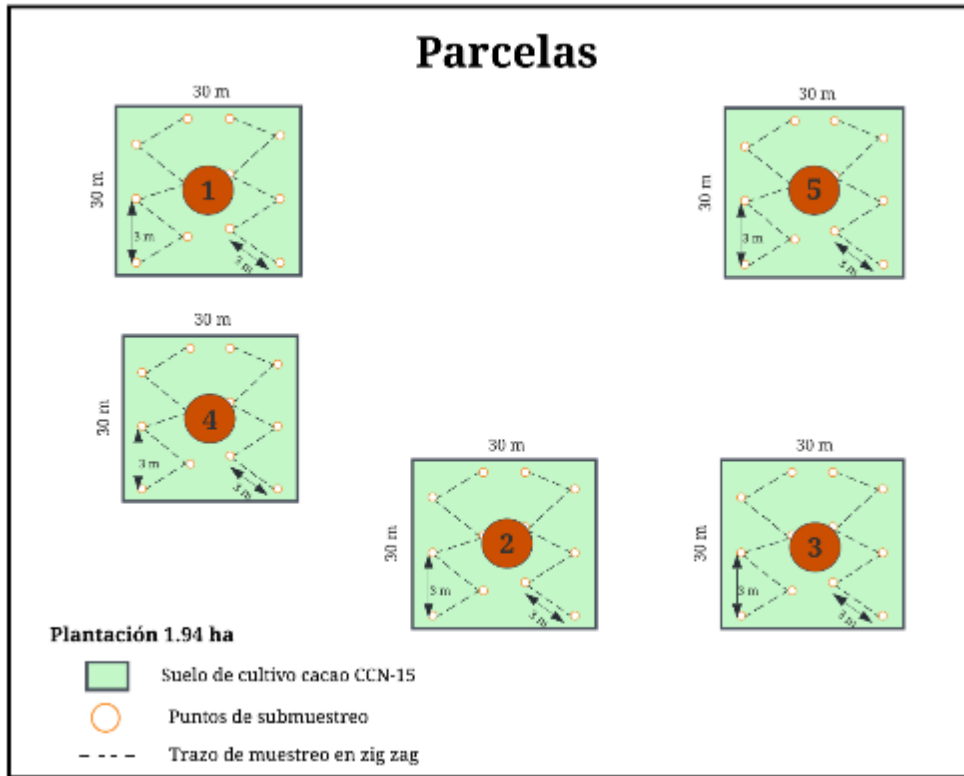
2.2.3. Recolección de muestras de suelo

Primeramente, la recolección dentro de las parcelas se llevó por medio de un trazado en zigzag, donde se removieron las impurezas superficiales del suelo (hojas secas, piedras, ramas, etc.) *Figura 4*. A continuación, se introdujo un barreno a la profundidad de 20 cm y a una distancia de 50 cm a 1 m del tallo del árbol de cacao. Después, se transfirieron 200 g de suelo en un balde de plástico aséptico y las herramientas se limpiaron luego de recolectar cada submuestra.

Para la preparación de la muestra compuesta se basó en el Instructivo de Muestreo para Análisis de Suelos INT/SFA/10 y la Norma Técnica Peruana NTP 339.089. para la obtención de muestras representativas (**Agrocalidad, 2018**). Para ello, se mezcló las submuestras del suelo recolectado sobre la superficie de un plástico limpio y se distribuyó de forma circular cada muestra para dividir las en cuatro cuadrantes. Posteriormente, se eliminó los cuadrantes opuestos y los sobrantes mezclaron nuevamente. Este procedimiento se repitió hasta reducir la muestra de 1 kg a 1.5 kg aproximadamente. Luego del cuarteo, se transfirió la cantidad resultante en envases de polietileno con boca ancha, para mantener el estado original evitando cualquier tipo de contaminación y transformación de las muestras.

Figuras 4.

Esquema de distribución zigzag que se utilizará en la toma de submuestras en 5 parcelas seleccionados.



2.2.4. Recolección de muestras de mazorcas de cacao

El muestreo de mazorcas de cacao, se basó en el procedimiento descrito por la Guía N°4 de muestreo de suelo, hojas y almendras para análisis de cadmio en cultivos de cacao del Ministerio de Agricultura y Ganadería (Argüello & Chávez, 2021). Para ello, se tomó dos mazorcas maduras en óptimas condiciones por parcela muestreada, con la finalidad de obtener una muestra representativa. A continuación, las muestras se procedieron a lavar para eliminar contaminantes superficiales. Por último, las mazorcas se depositaron en fundas herméticas de polipropileno y fueron selladas herméticamente, para evitar cualquier tipo de contaminación.

2.2.5. Conservación y transporte de muestras

Todas las muestras se refrigeraron en *coolers* con hielo seco una temperatura de entre 4 - 6°C y transportadas con brevedad hasta el Laboratorio de la UODIDE de la Universidad técnica de Ambato donde se conservaron en refrigeración a 4 °C basándose en el Instructivo de Muestreo para Análisis de Suelos INT/SFA/10 y prácticas estándar para la conservación y el transporte de muestras de suelo (**Agrocalidad, 2018**). Por otro lado, para la identificación de todas las muestras se empleó un etiquetado conformado por dos códigos de muestreo, uno para suelo de cultivo y otro para la mazorca del cacao UTA-FCIAB-SC-M# y UTA-FCIAB-MC-M#, respectivamente. Para cada muestra recolectada se llenó una cadena de custodia a fin de asegurar la calidad del muestreo (**Anexo 6 y 7**).

2.2.6. Medición de parámetros fisicoquímicos

2.2.6.1. Potencial hidrógeno pH y conductividad

Para la determinación de pH y conductividad eléctrica en granos de cacao se molió homogéneamente 10 gramos de granos de cacao y se preparó una suspensión en 90 mL agua destilada. Después se agitó por 10 minutos y se dejó en reposo por 24 horas. Transcurrido el tiempo se determinó el valor de pH y conductividad con la ayuda de un pH-Meter electrónico Accumet AB200, de acuerdo con el método reportado por **Loo Miranda (2022)**.

2.2.6.2. Contenido de humedad

En las muestras de suelos y granos de cacao se procedió a analizar el porcentaje de humedad por el método de desecación por estufa en una estufa utilizando el método oficial analítico de contenido de humedad (**Brunelle, 2020**); donde cada muestra se analizó por triplicado. Primeramente, se secaron los crisoles vacíos sin tapa en la estufa a 105°C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo se transfirieron al desecador hasta obtener un peso constante para posteriormente pesarlos con la ayuda de la balanza

analítica *Radwa*. Después, las muestras se homogenizaron y molieron, hasta obtener un tamaño de partícula que pudo ser tamizado fácilmente. Posteriormente, se pesó 10 g de suelo y 6 g de granos de cacao en los crisoles, mismos que se colocaron en la estufa a 105 °C a 24 y 6 horas respectivamente como describe la norma INEN 173 (**Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, 2015**). Finalizado el tiempo se trasladaron los crisoles al desecador, se enfriaron y se registró el peso de cada uno. El contenido de humedad se expresó en porcentaje masa (% m/m) por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} * 100$$

(Ec.1)

Donde:

P₁: Peso en gramos de la muestra antes del secado.

P₂: Peso en gramos de la muestra después del secado.

2.2.6.3. Contenido de materia orgánica

El contenido de materia orgánica en las muestras de suelo y granos de cacao se determinó por el método de pérdida de peso por ignición (*Loss On Ignition -LOI*) descrito por **Barrezueta et al. (2020)**, donde cada muestra se analizó por triplicado. Primeramente, se pesó 10 g de suelo y 6 g de grano de cacao. Luego las muestras se secaron en la estufa a 105°C durante 24 y 6 horas respectivamente, finalizado el tiempo se enfriaron y se pesaron. Posteriormente, las muestras se colocaron en la mufla a 550° C durante 2 y 1 hora respectivamente, finalizado el tiempo se enfriaron hasta obtener un peso constante y se registró su peso (**Anexo 1 y 2**). El contenido de materia orgánica se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Materia orgánica} = \frac{A - B}{A} * 100$$

(Ec.2)

Donde:

A: Peso en gramos de la muestra después del secado.

B: Peso en gramos de la muestra después de la ignición.

2.2.7. Digestión de las muestras de suelo y granos de cacao

La digestión de muestras de suelo y granos de cacao se basó en el método U.S. EPA 3051 A, empleando como digestor el ácido nítrico (HNO_3) y el sistema de microondas *ETHOS UP MILESTONE CONNECT* (**Environmental Agency Protection EPA, 2007**). Inicialmente se limpió los vasos de digestión del equipo calentándolos con HNO_3 al 65 %. Luego se lavó con agua y se secó en un ambiente aséptico. De igual manera, todo el material de plástico o vidrio que tuvo contacto con las muestras se lavó con HNO_3 diluido al 10%.

Para las muestras de suelo y grano de cacao secadas y molidas, se colocaron aproximadamente 0.5 gramos de cada muestra en vasos de digestión TFM (teflón) y se agregó 5 mL de HNO_3 al 65 % más 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30 %, bajo la campana de extracción. Posteriormente, se tapó el vaso de TFM para seguidamente llevarlo al plato giratorio del digestor de microondas; se empleó 2 rampas de calentamiento aplicando 1000 W de potencia: (a) temperatura ambiente a 170 °C en 15 min; (b) manteniendo una temperatura constante de 170 °C durante 25 min. Trascurrido el tiempo de digestión (45 min) se dejó enfriar por un mínimo de 5 minutos y se retiraron los vasos de TFM del microondas. Finalmente, cuando los vasos alcanzaron una temperatura ambiente se transvasó su contenido en balones de aforo de 100 mL y se conservaron en frascos ámbar de 250 mL a 4°C (**Anexo 3**).

2.2.8. Determinación de metales por espectrofotometría de absorción atómica

Para la determinación de la concentración de cadmio (Cd), plomo (Pb), níquel (Ni) y arsénico (As) en suelo de cultivo y granos de plantaciones de cacao, se aplicó la técnica de espectrometría de absorción atómica basado en el método oficial analítico 999.11 de la AOAC (**Association of Official Analytical Chemists, 2005**) y el método 7000 A de la U.S. EPA. Para ello, se empleó el espectrofotómetro de Absorción Atómica modelo *PG INSTRUMENTS AA500* con el sistema de horno de grafito y estándares comerciales monoelementales (*AccuStandar*) de 1000 µg/L listados en la siguiente tabla:

Tabla 17.

Estándares monoelementales (AccuStandar) de 1000 µg/L.

Elemento	N° de Catálogo	Proveedor
Arsénico (As)	AA03N-1	AccuStandart, New Haven, USA
Cadmio (Cd)	AA08N-1	AccuStandart, New Haven, USA
Plomo (Pb)	AA29N-1	AccuStandart, New Haven, USA
Níquel (Ni)	AA37N-1	AccuStandart, New Haven, USA

Primeramente, se preparó una solución madre de 1000 ppm a un volumen de 1 L del estándar monoelemental en HNO₃ al 1% (v/v). A partir de la solución madre se prepararon seis soluciones a concentraciones dentro del rango de la recta de calibración. Posteriormente con el uso del equipo espectrofotométrico se configuró la inyección a un volumen de 10 µL para el agua destilada considerada como blanco y las soluciones preparadas, la medición de absorbancia se realizó por quintuplicado. Finalmente, se elaboró una curva de calibración en el rango y límite de detección sugeridos por el proveedor del equipo, *Analytical Cookbook PG Instruments (PG Instruments, 2014)*, indicado en la siguiente tabla:

Tabla 18.*Rango de la recta de calibración y límites de detección.*

Metales	Longitud de onda (nm)	Rango de la recta de calibración (µg/L)	Límite de detección (µg/L)
Cadmio (Cd)	228.8	0 – 9	0.0002
Plomo (Pb)	283.3	0 – 150	0.0038
Níquel (Ni)	232	0 – 300	0.0085
Arsénico (As)	193.7	0 – 300	0.0171

Nota. Obtenido de *Analytical Cookbook PG Instruments*

Una vez obtenida la curva de calibración, se comenzó con la medición de los metales en las muestras de suelo de cultivo y granos de cacao. Se prepararon las muestras, el blanco y un estándar de referencia para el control de la sensibilidad del equipo. Finalmente, se configuró el equipo con el programa de temperatura de detección respectivo para cada metal sugeridos en el *Analytical Cookbook PG Instruments*, así como la inyección de 10 µL de blanco, estándar y las muestras con mediciones de absorbancia por triplicado. La lectura del equipo se obtuvo en unidades de (µg/L) por lo cual, se calculó la conversión a unidades de (mg·kg⁻¹) de concentración de metal mediante las siguiente ecuaciones:

$$\text{Metal (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{\text{Lectura (}\mu\text{g/L)}}{1000}$$

(Ec.3)

$$\text{Metal (mg} \cdot \text{kg}^{-1}) = \frac{\text{Metal (mg} \cdot \text{L}^{-1}) \cdot \text{Aforo} \cdot 1000}{1000 \cdot \text{Peso de la muestra (g)}}$$

(Ec.4)

Donde:

Lectura: Concentración de salida digital del equipo en $\mu\text{g/L}$.

Aforo: Volumen al cual la digestión se aforo.

2.2.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de Cd, Pb, Ni, y As, se expresaron como media \pm desviación estándar de tres réplicas ($n=3$) para cada. Los valores se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor con comparación de medias Tukey (prueba t) con un nivel de significancia del 95 % ($p < 0.05$) utilizando Minitab Statistical Software 19.1.0.1.

2.2.10. Análisis de Correlación de Pearson

Se estudió la posible correlación existente entre los principales parámetros fisicoquímicos, pH y contenido de materia orgánica en el suelo con relación a las concentraciones de metales pesados en suelo y granos de cacao en la plantación cacaotera. Para ello, se realizó un análisis estadístico de coeficientes de correlación de Pearson a un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$) utilizando el software de hojas de cálculo Microsoft Excel complementado con Minitab Statistical Software 19.1.0.1

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Parámetros fisicoquímicos en muestras de suelo

Los resultados obtenidos de cada parámetro fisicoquímicos analizado se detallan a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 19.

Parámetros fisicoquímicos de muestras de suelos de cultivo en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Ríos.

Parcelas de muestreo	pH	CE (dS·m ⁻¹)	% Humedad	% MO
1 ^{er}	5.61 ± 0.42 ^c	0.022 ± 0.002 ^a	27.99 ± 0.44 ^b	12.69 ± 0.05 ^a
2 ^{do}	5.63 ± 0.12 ^c	0.018 ± 0.003 ^b	27.57 ± 0.52 ^b	12.03 ± 1.30 ^a
3 ^{ro}	5.63 ± 0.14 ^c	0.021 ± 0.001 ^a	29.03 ± 1.37 ^b	11.04 ± 0.99 ^a
4 ^{to}	5.71 ± 0.22 ^b	0.019 ± 0.006 ^b	32.98 ± 0.56 ^a	10.78 ± 1.96 ^a
5 ^{to}	5.74 ± 0.53 ^a	0.014 ± 0.001 ^c	31.94 ± 0.12 ^a	11.28 ± 0.09 ^a

^{a, b, c, d} Letras distintas en la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores son expresados como la media ± desviación estándar de tres réplicas ($n=3$) en cada parámetro analizado. **CE**= Conductividad eléctrica **MO**= Materia orgánica

3.1.1.1. Potencial de hidrógeno (pH) y conductividad eléctrica (CE)

Los valores de pH en el suelo obtenidos de las cinco parcelas muestreadas oscilaron entre 5.61 y 5.74, como se detallan en la **Tabla 18**. Con relación al análisis de varianza

(ANOVA) y la prueba de Tukey realizado a un nivel de confianza del 95 % se encontró diferencias significativas entre las medias de la cuarta y quinta parcela hacia las tres primeras parcelas que presentan igualdad. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, el pH del suelo de cultivo de cacao, se considera “Moderadamente Ácido”, al estar en el rango de pH de 5.1 a 6.5 (SEMARNAT, 2002). Acorde a **Rodríguez-Velázquez et al. (2022)**, el cacao debe cultivarse en suelos con un rango de pH entre 6.0 y 6.5; debido a que en este rango los minerales y nutrientes son más solubles, facilitando la adsorción por parte de las plantas.

En relación con estudios ejecutados por **Chavez et al. (2015)** en 15 provincias del país donde se cultiva cacao, el pH del suelo de las plantaciones se encontró en el rango de 4.10 a 7.97, fluctuando en suelos fuertemente ácidos a suelos mediantemente alcalinos. El pH es el adecuado para cultivo de cacao y los valores ácidos pueden deberse a un alto contenido de Al^{3+} o un bajo contenido de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ ; para ello es recomendable emplear cal dolomita (**Arham et al., 2017**). De acuerdo con, **van Vliet & Giller (2017)** el cacao tolera condiciones ácidas siempre que al suelo se le proporcione los nutrientes adecuados.

En el caso de la CE los valores oscilaron entre $0.014 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ y $0.022 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ como se detallan en la **Tabla 18**. Con relación al análisis estadístico se determinó que no existen diferencias entre las medias de la segunda y cuarta parcela, al igual que la primera y quinta parcela. Mientras que la quinta parcela se diferencia significativamente de las demás. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, la CE del suelo presenta “efectos despreciables de salinidad”, al poseer $< 1 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ que no afectan a los cultivos (SEMARNAT, 2002). Estudios llevados a cabo por **Brito-Vega et al., (2018)** determinaron que los niveles de CE en cultivos están influenciados por el bajo pH del suelo y un bajo contenido de Ca^{2+} y Mg^{2+} ; mismos que están presentes en el suelo estudiado. Estudios similares a la investigación registraron valores de CE entre 0.25 a $0.65 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ en plantaciones cacaoteras de la Amazonia ecuatoriana (**Morales & Serrano, 2019**).

3.1.1.2. Contenido de humedad

La disponibilidad de agua en el suelo desempeña un papel importante en la distribución de nutrientes en el suelo. En la **Tabla 18**, se reportan los porcentajes de humedad en las cinco parcelas se encuentran entre 27.57 a 32.98 % y por medio del análisis estadístico no se evidenció diferencias significativas en las medias de las tres primeras parcelas, que se diferencia de las últimas dos parcelas. Por lo cual, el contenido de humedad es óptimo para el cacao como mencionan **Abdulai et al. (2018)** las plantaciones prosperan en suelos con un nivel de humedad entre el 20 y el 60 %, que proporciona a las raíces espacios de drenaje y aireación. Sin embargo, la humedad es dinámica por las estaciones e influida por la presencia de sombra que reduce la evapotranspiración (**Niether et al., 2017**).

3.1.1.3. Materia orgánica (MO)

La materia orgánica mejora la estructura del suelo, otorgando la capacidad de intercambiar macro y micronutrientes. El contenido de MO determinada en el suelo de las cinco parcelas arrojó valores de entre 10.78 a 12.69 % como se detallan en la **Tabla 18**. Por medio del análisis estadístico se comprobó que no existe diferencia significativa entre las medias de las parcelas. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, el contenido de MO en el suelo se clasifica en “clase alta”, debido a que se encuentran en el rango de entre 11.0 a 16.0 % (**SEMARNAT, 2002**).

El % de MO presente en el suelo estudiado es adecuado para el cultivo de cacao, como lo indica (**Zhou et al., 2019**), debido a que supera el contenido mínimo de 3 a 5 %. El alto contenido de MO del suelo se da principalmente a las grandes cantidades de residuos orgánicos de restos vegetales de mazorca de cacao y hojarasca, que se mineralizan muy lentamente y se acumulan en la superficie del suelo. Los valores obtenidos tienen relación con estudios de sistemas agroforestales de cacao realizados en la provincia de Los Ríos y Manabí, donde obtuvieron valores entre 13.67 y 30 % de MO respectivamente (**Mendoza et al., 2022; Novillo Espinoza et al., 2018**).

3.1.2. Parámetros fisicoquímicos en muestras de grano de cacao.

Los resultados obtenidos de cada parámetro se detallan a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 20.

Parámetros fisicoquímicos en muestras de granos cacao en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.

Parcelas de muestreo	pH	CE (uS·cm ⁻¹)	% Humedad	% MO
1 ^{er}	6.08 ± 0.22 ^a	36.08 ± 0.73 ^b	18.33 ± 0.11 ^a	96.37 ± 0.88 ^a
2 ^{do}	5.95 ± 0.23 ^b	49.89 ± 0.78 ^a	20.46 ± 0.85 ^a	97.80 ± 0.81 ^a
3 ^{ro}	6.03 ± 0.42 ^{ab}	36.14 ± 1.60 ^b	19.25 ± 1.41 ^a	96.72 ± 0.46 ^a
4 ^{to}	6.02 ± 0.55 ^{ab}	28.06 ± 1.06 ^c	19.92 ± 0.50 ^a	96.51 ± 0.57 ^a
5 ^{to}	6.03 ± 0.43 ^{ab}	22.28 ± 0.81 ^d	17.65 ± 1.65 ^a	97.78 ± 0.87 ^a

^{a, b, c, d} Letras distintas en la misma columna representan diferencias significativas. Los valores son expresados como la media ± desviación estándar de tres réplicas (n=3) en cada parámetro analizado. **CE**= Conductividad eléctrica **MO**= Materia orgánica

3.1.2.1. Potencial de hidrógeno (pH) y conductividad eléctrica (CE)

El pH en granos de cacao es un factor muy importante debido a que, otorga las características organolépticas adecuadas para la elaboración de derivados (**Apriyanto, 2017**). El pH fue analizado en granos frescos de las cinco parcelas muestreadas, donde se obtuvieron valores de entre 5.95 a 6.08, como se detalla en la **Tabla 19**. Con relación al análisis estadístico se determinó diferencias significativas entre las medias de las dos primeras parcelas. Estudios realizados por **Peláez et al. (2016)** reportaron valores de pH entre 6.99 a 7.08 en granos de cacao de la variedad CCN-51 a 0 días del empezar la fermentación. Mientras que **Loo Miranda (2022)** obtuvo valores de pH de 5.98 en granos a 48 h empezadas la fermentación, debido a que en esta etapa disminuye el pH por los azúcares transformados en ácidos orgánicos.

Las mediciones de CE fueron efectuadas en los granos obtuvieron valores de entre 22.28 a 49.89 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ como se detalla en la **Tabla 19**. Presentando la segunda parcela una elevada conductividad y mediante al análisis estadístico se determinó diferencias significativas entre las parcelas. Estudios enfocados en la medición de la CE en granos de cacao de la variedad CCN-51, obtuvieron valores de 38.45 y 56.1 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 24 horas iniciada la fermentación (**Loo Miranda et al., 2020**). Acorde a **Ikegwu (2021)** la CE está influenciada por el contenido de humedad del grano, debido que la misma eleva el número de electrolitos cuando fermenta el grano. Por lo cual, acorde a los valores obtenidos de pH y CE el grano fresco se encontraba en etapas iniciales de fermentación y pudo ser causado porque se analizaron 48 a 72 h después de su recolección.

3.1.2.2. Contenido de humedad

El contenido de humedad en granos de cacao es fundamental para la obtención de granos de calidad, debido a que regula propiedades físicas como la forma, tamaño, resistencia al aplastamiento, densidad y porosidad (**Ackah & Dompey, 2021**). Para la determinación de humedad se obtuvieron valores en el rango de entre 17.65 a 20.46 % como se detalla en la **Tabla 19**. Con relación al análisis estadístico se determinó que no se encuentran diferencias significativas entre las medias de los granos en las cinco parcelas muestreadas. Estudios sobre la variación del contenido de humedad en el proceso de fermentación de granos, obtuvieron valores de 16.60 % en granos frescos y 51.89 % a 4 días de comenzada la fermentación (**Wahyuni et al., 2018**). Mismo que recalca que los granos estudiados iniciaban su fermentación y de acuerdo con **Ackah & Dompey (2021)** es posible haber tenido crecimiento de moho interno. Cabe recalcar que los granos de cacao después de ser fermentados y secados a un proceso industrial no deben superar el 7% de contenido de humedad.

3.1.2.3. Materia orgánica (MO)

El grano de cacao fresco tiene una composición orgánica aproximada de un 95-98 % distribuida en: 32 % grasa, 15 % proteínas, 6 % polifenoles, 6 % almidón, 6 %

pentosanos, 3 celulosa, 3 % sacarosa, 6 % polifenoles, 1 % ácidos orgánicos, 3 % teobromina y 1 % cafeína (Figueroa-Hernández et al., 2019). El contenido de MO determinada en base seca, es decir, sin contenido de agua en los granos de cacao de las cinco parcelas, arrojó valores de entre 96.37 a 97.80 % como se detallan en la **Tabla 19**. Por lo tanto, el contenido de MO en los granos de cacao es el adecuado. Por medio del análisis estadístico se comprobó que no existe diferencias significativas entre las medias de los granos en las parcelas.

3.1.3. Determinación de cadmio en muestras de suelo y granos de cacao

El contenido de Cd en el suelo de cultivo de las cinco parcelas vario entre 0.23 a 1.78 mg·kg⁻¹ como se detalla en la **Tabla 20**. La tercera parcela y primer parcela muestran el mayor contenido de Cd las cuales superan el LMP, según el TULSMA. Mientras que las demás parcelas se mantienen por debajo del LMP como se observa en la **Figura 5**. Por medio del análisis estadístico se evidenció diferencia significativa en la media de la tercera parcela contra las demás. El suelo de cultivo en la plantación cacaotera presenta una concentración media de 0.69 mg·kg⁻¹, indicando contaminación de este metal .

Tabla 21.

Concentración de metales pesados en muestras de suelos de cultivo en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.

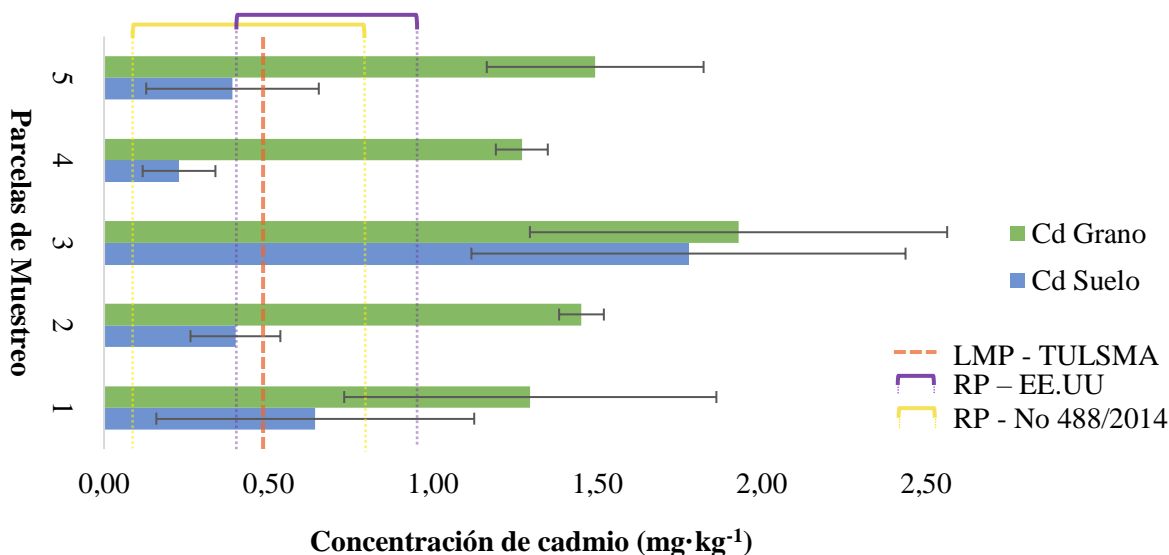
Parcelas de Muestreo	Cadmio (mg·kg ⁻¹)	Plomo (mg·kg ⁻¹)	Níquel (mg·kg ⁻¹)	Arsénico (mg·kg ⁻¹)
1 ^{er}	0.64 ± 0.48^b	5.48 ± 2.17 ^c	10.16 ± 2.36 ^b	15.51 ± 3.33^{ab}
2 ^{do}	0.40 ± 0.14 ^b	14.56 ± 2.76 ^{ab}	12.50 ± 2.87 ^b	9.14 ± 0.45 ^b
3 ^{ro}	1.78 ± 0.74^a	13.37 ± 1.88 ^b	10.83 ± 2.94 ^b	7.37 ± 1.64 ^b
4 ^{to}	0.23 ± 0.11 ^b	6.35 ± 2.62 ^c	22.84 ± 1.88^a	21.65 ± 3.76^a
5 ^{to}	0.39 ± 0.26 ^b	19.59 ± 1.42^a	25.27 ± 1.62^a	15.31 ± 4.90^{ab}

^{a, b, c, d} Letras distintas en la misma fila representan diferencias significativas. Valores son expresados como la media ± desviación estándar de tres réplicas (n=3) en cada metal.

Las posibles causas de los niveles altos de Cd en las parcelas, como lo mencionan **Gil et al. (2022)** son el, pH bajo, riego con agua que contiene Cd y fertilizantes. Los niveles de Cd en las demás parcelas se encuentran acorde al contenido de Cd en la corteza terrestre (0.01 a 1 mg·kg⁻¹) (**Kubier et al., 2019**). Los valores obtenidos presentan similitud a estudios del suelo en plantaciones de cacao del país, donde se obtuvieron concentraciones entre 0.88 a 2.45 mg·kg⁻¹ en la Provincia del Guayas, 0.02 a 6.90 mg·kg⁻¹ en 15 provincias y 0.8 a 2.74 mg·kg⁻¹ en la Provincia de Manabí (**Argüello et al., 2019; Intriago et al., 2021**); mismos autores hacen referencia el Cd está presente por los antecedentes históricos de cenizas volcánica y polvo continental del Ecuador.

Figuras 5.

Concentración de Cd en muestras de suelos del cultivo y en granos de cacao de plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.



Nota. La línea entrecortada= LMP de Cd (**0.5 mg·kg⁻¹**) en suelos de cultivo. Corchetes= Rango permisible (RP) de Cd en cacao descritos según el Reglamento 488/2014 de la Unión Europea (**0.1 – 0.8 mg·kg⁻¹**) y la Proposición 65 del Acuerdo Industrial en EE.UU. (**0.4 – 0.96 mg·kg⁻¹**).

El contenido de Cd en los granos de cacao de las cinco parcelas vario entre 1.30 a 1.93 mg·kg⁻¹ como se detalla en la **Tabla 21**. Por medio del análisis estadístico se comprobó que no existe diferencias significativas entre las medias en los granos. Dichos valores

superaron el RP de Cd establecido por el Reglamento No 488/2014. De igual manera, superaron el RP de Cd en chocolate, establecido en EE.UU; como se observa en la **Figura 5**. Los valores representan un problema en comercialización debido a que compradores asocian los niveles de Cd en granos con el producto final a elaborar.

En el año 2018, Agrocalidad juntamente con investigadores de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) elaboraron un mapa del contenido de Cd en granos de cacao en Ecuador, en el cual la Provincia de Ríos presenta valores entre 0.16 a 1.52 mg·kg⁻¹ (**Argüello et al., 2019**); mismos que se asemejan a los obtenidos en el presente estudio. Las posibles causas del alto contenido de Cd, son un pH ácido y alto contenido de materia orgánica; además de poseer idéntica carga y comportamiento químico al Ca²⁺ facilitando la absorción y acumulación de Cd en la planta (**Vanderschueren et al., 2021**).

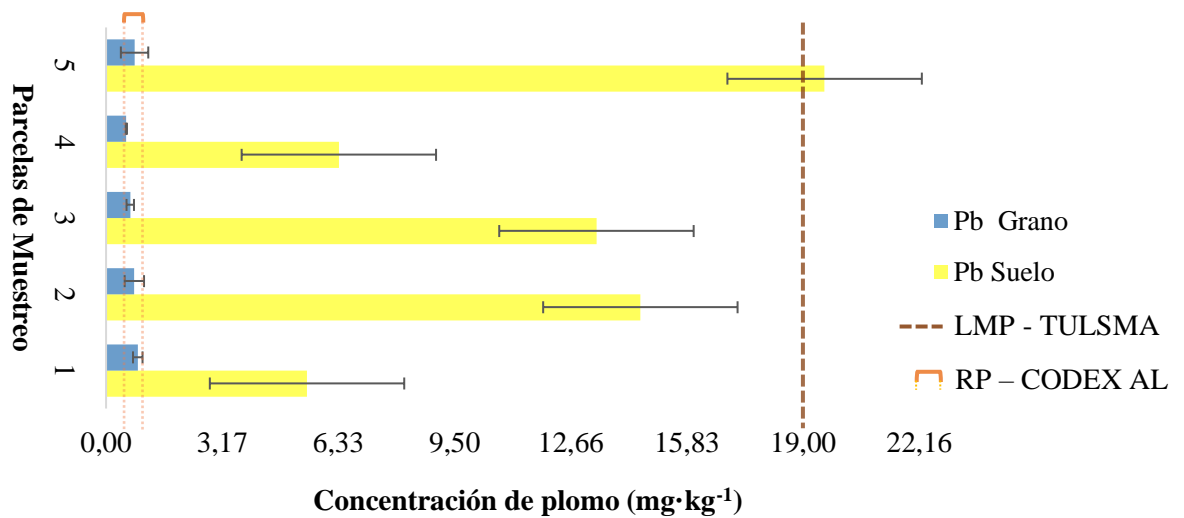
3.1.4. Determinación de plomo en muestras de suelo y granos de cacao

El contenido de Pb en el suelo de cultivo de las cinco parcelas vario entre 5.48 a 19.59 mg·kg⁻¹ como se observa en la **Tabla 20**. Por medio del análisis estadístico se evidenció diferencias significativas entre las medias de la primera, tercera y quinta parcela, esta última superando el LMP, según el TULSMA. Mientras que las demás parcelas se mantienen por debajo del límite, como se observa en la **Figura 6**. El suelo de cultivo en la plantación cacaotera, presenta una concentración media de 11.87 mg·kg⁻¹, siendo adecuadas para el manejo y cultivo de cacao.

Según **Oorts et al. (2021)** el contenido natural de Pb en el suelo oscila entre 10 y 40 mg·kg⁻¹. El alto contenido de Pb en el suelo es un problema asociado al uso de pesticidas. Acorde a encuestas realizadas por **Calle, (2021)** a agricultores cacaoteros de la provincia de los Ríos, los pesticidas como el arseniato de plomo son ampliamente usados contra plagas de los cultivos. Los valores obtenidos son similares a estudios efectuados en plantaciones de arroz, plátano y cacao en la provincia de Los Ríos, donde determinaron que el contenido de Pb en suelos es de 17.80, 17.12 y 9.64 mg·kg⁻¹ respectivamente (**Atiaga et al., 2021; Uriña, 2022**).

Figuras 6.

Concentración de Pb en muestras de suelos del cultivo y en granos de cacao de plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.



Nota. Línea entrecortada= LMP de Pb ($19 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en suelos de cultivo. Corchete= RP de Pb ($0.5 - 1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en productos de cacao descritos legislaciones de países a los que Ecuador exporta cacao.

El contenido de Pb en los granos de cacao de las cinco parcelas muestreadas vario entre 0.55 a $0.86 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ como se detalla en la **Tabla 21**. Por medio del análisis estadístico se comprobó que no existe diferencia significativa entre las medias de los granos. En comparación con el RP de Pb en productos derivados de cacao, los valores obtenidos en el estudio se encuentran adecuados por diferentes legislaciones de países importadores de cacao y derivados, como se observa en la **Figura 6**, no perjudicando su comercialización.

Tabla 22.

Concentración de metales pesados en muestras de granos de cacao de plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.

Parcelas de Muestreo	Cadmio (mg·kg⁻¹)	Plomo (mg·kg⁻¹)	Níquel (mg·kg⁻¹)	Arsénico (mg·kg⁻¹)
1^{er}	1.30 ± 0.57^a	0.86 ± 0.13 ^a	2.90 ± 0.28^a	3.37 ± 0.02^a
2^{do}	1.45 ± 0.07^a	0.77 ± 0.26 ^a	2.85 ± 0.38^a	4.03 ± 1.03^a
3^{ro}	1.93 ± 0.63^a	0.66 ± 0.10 ^a	3.80 ± 0.83^a	3.44 ± 0.08^a
4^{to}	1.27 ± 0.08^a	0.55 ± 0.02 ^a	3.19 ± 0.55^a	3.97 ± 2.46^a
5^{to}	1.49 ± 0.33^a	0.78 ± 0.37 ^a	3.33 ± 0.27^a	3.55 ± 0.07^a

a, b, c, d Letras distintas en la misma fila representan diferencias significativas. Los valores son expresados como la media ± desviación estándar de tres réplicas (n=3) en cada metal.

El alto contenido de Pb en el suelo y el bajo contenido en el grano está influenciado porque el metal tiene baja movilidad en el suelo. Además, las plantas absorben y acumulan Pb en las raíces, pero este, no siempre penetra la endodermis de la raíz (**Reis et al., 2015**). Los valores obtenidos varían acorde a estudios realizados en granos de cacao de la variedad CCN-51, provenientes de las provincias de los Ríos, Guayas y regiones del Perú; donde determinaron concentraciones de Pb con una media de 1.432 mg·kg⁻¹, 0.09 y 0.67 mg·kg⁻¹ respectivamente; dando a resaltar las diferencias entre zonas geográficas (**Batallas et al., 2021; Romero-Estévez et al., 2019**).

3.1.5. Determinación de níquel en muestras de suelo y granos de cacao

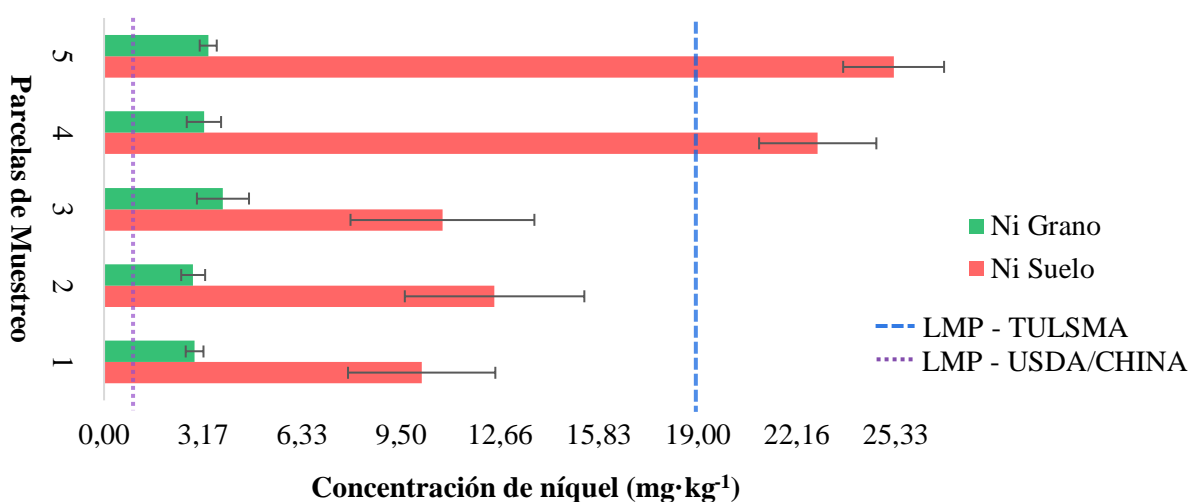
El contenido de Ni en el suelo de cultivo de las cinco parcelas vario entre 10.16 a 25.27 mg·kg⁻¹ como se detalla en la **Tabla 20**. Por medio del análisis estadístico se evidenció diferencias significativas entre las medias de las tres primeras parcelas contra las dos últimas. La quinta y cuarta parcela muestran el mayor contenido de Ni superando el LMP, según el TULSMA. Mientras que las tres primeras parcelas se mantienen por debajo del límite como se observa en la **Figura 7**. El suelo de cultivo en la plantación

cacaotera, presenta una concentración media de $16.32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, siendo adecuadas para el manejo y cultivo de cacao.

El níquel está presente en todos los suelos del planeta a concentraciones de 20 a $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. La alta acumulación de Ni en el suelo es posible a ser originada por el historial volcánico del país, como también, el pH donde la movilidad y solubilidad del Ni aumenta, además de altos contenidos de materia orgánica, con los que forma complejos móviles. Estudios realizados en plantaciones cacaoteras de Colombia, Ecuador y Perú determinaron Ni en el suelo con medias de $16.22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $17.20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y un rango de $8.1 - 37 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectivamente (Aguirre-Forero et al., 2020; Barraza et al., 2021). Por lo tanto, el exceso de Ni da paso a la acumulación en suelo y tejidos de las plantas de cacao.

Figuras 7.

Concentración de Ni en muestras de suelos del cultivo y en granos de cacao en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.



Nota. Línea entrecortada= LMP de Ni ($19 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en suelos de cultivo. Línea punteada= el LMP de Ni ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en productos alimenticios descritos según USDA y el Gobierno de China.

El contenido de Ni en granos de cacao de las cinco parcelas vario entre 2.85 a $3.80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ como se detalla en la **Tabla 21**. Por medio del análisis estadístico se comprobó

que no existe diferencia significativa entre las medias de los granos. En comparación con el LMP de Ni en productos alimenticios, se sobrepasa el mismo, indicando una contaminación como se observa en la *Figura 7*, lo cual causa una problemática en la comercialización.

Los principales factores en la adsorción y acumulación de Ni en las plantas de cacao, según **Arham et al. (2017)** son un pH ácido en suelo y participación en el proceso de fijación de nitrógeno (N) en plantas, donde es cofactor de la enzima ureasa (**Jakubus & Graczyk, 2020**). Estudios similares realizados en granos de cacao de la variedad CCN-51 en Ecuador y Perú determinaron Ni en un rango de 1.46 a 8.53 mg·kg⁻¹ y 3.9 a 9.25 mg·kg⁻¹, respectivamente (**Arévalo-Gardini et al., 2017; Romero-Estévez et al., 2019**). Por otro lado, **Kruszewski et al. (2018)** determinó 2.7 y 8.5 mg·kg⁻¹ en tabletas de chocolate, encontrándose relacionados con el contenido de Ni en granos de cacao.

3.1.6. Determinación de arsénico en muestras de suelo y granos de cacao

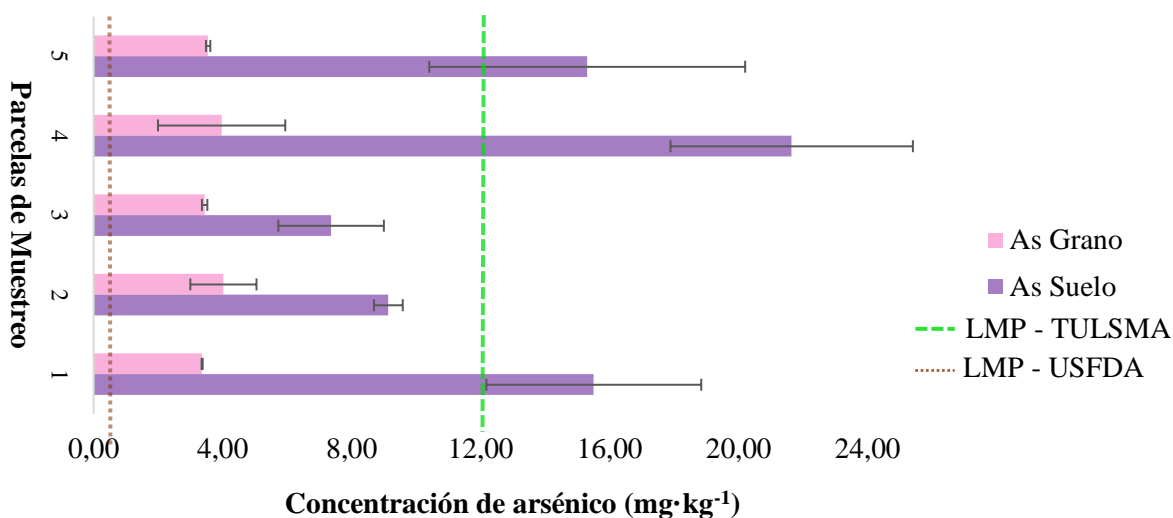
El contenido de As en el suelo de cultivo de las cinco parcelas vario entre 7.37 a 21.65 mg·kg⁻¹ como se detalla en la *Tabla 20*. Por medio del análisis estadístico se evidenció diferencias significativas entre las medias de la cuarta parcela hacia la segunda y tercera parcela, por sus altos valores. La cuarta, primera y quinta parcela muestran el mayor contenido de As, las cuales superan el LMP establecido por el TULSMA, mientras que la segunda y tercera parcela se mantiene por debajo del LPM como se observa en la *Figura 8*. El suelo de cultivo en la plantación cacaotera, presenta una concentración media de 13.80 mg·kg⁻¹, indicando contaminación de este metal hacia el cultivo.

Acorde a **Kayode et al. (2021)** la concentración de As en los suelos varía según las regiones geográficas y en el caso de Latinoamérica está relacionado con rocas volcánicas. De igual manera, **Bundschuh et al. (2021)** resalta que los ríos del Ecuador empleados en el riego de cultivos son contaminados por actividades mineras. Sin descartar el uso de fertilizantes y pesticidas. Los valores obtenidos en el presente

estudio son similares a estudios realizados en plantaciones de arroz y cacao de la provincia de los Ríos, cuáles determinaron contenidos de As a profundidades de 15 y 30 cm con una media de $6.78 \pm 4.85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $5.49 \pm 1.28 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectivamente (Atiaga et al., 2021; Otero et al., 2016).

Figuras 8.

Concentración de As en muestras de suelos del cultivo y en granos de cacao en plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, Los Ríos.



Nota. Línea entrecortada= LMP de As ($12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en suelos de cultivo. Línea punteada= LMP de As ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en granos de cacao descritos según el nivel máximo de contaminantes por parte de China y USFDA.

El contenido de As total en granos de cacao de las cinco parcelas vario entre 3.37 a 4.03 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ como se detallan en la **Tabla 21**. Por medio del análisis estadístico se comprobó que no existe diferencias significativas entre las medias de los granos. Acorde al LMP establecido por China y USFDA en productos derivados de cacao; los valores superan ampliamente como se observa en la **Figura 8**, lo cual conlleva a una elevada contaminación de este metal, afectando la comercialización de los mismos.

Según **Dradrach et al. (2020)** el As es poco soluble en los suelos; sin embargo, las plantas lo absorben mediante la gradiente de concentración entre el suelo y la raíz. Sin embargo, el estrés en la planta por As puede provocar daños a nivel celular y

molecular, permitiendo el ingreso en grandes cantidades. Estudios similares al presente en Indonesia y Ghana determinaron concentraciones de As en granos de cacao < 0.1 mg·kg⁻¹ (Assa et al., 2018; Nnuro et al., 2020). Mientras que en granos de cacao de la variedad CCN-51 en las provincias de los Ríos y Cotopaxi obtuvieron una media de 2.04 mg·kg⁻¹ (Neira et al., 2021). Por lo tanto, los estudios descritos infieren que en el país existe una grave contaminación por As en suelo y productos agrícolas.

3.1.7. Correlación entre parámetros fisicoquímicos del suelo y concentraciones de metales pesados en muestras de suelo y grano de cacao

Se determinó una correlación existente entre el pH y el contenido de Ni del suelo, y entre las concentraciones de Cd en suelo y Cd en grano de cacao, como se detalla en la **Tabla 22**. En consecuencia, a los valores obtenidos entre variables se estableció un criterio de correlación, como se detalla en la **Tabla 23** con base a lo descrito por (Hernández et al., 2018); con la finalidad de interpretar los coeficientes de correlación entre las variables.

Tabla 23.

Matriz de correlación de parámetros fisicoquímicos del suelo y concentraciones de metales pesados en el suelo de cultivo y granos de cacao.

	pH Suelo	%MO Suelo	Cd Grano	Cd Suelo	Pb Grano	Pb Suelo	Ni Grano	Ni Suelo	As Grano	As Suelo
pH Suelo	1									
%MO Suelo	-0.81	1								
Cd Grano	-0.21	-0.35	1							
Cd Suelo	-0.43	-0.23	0.92*	1						
Pb Grano	-0.39	0.88	-0.15	-0.16	1					
Pb Suelo	0.39	-0.25	0.48	0.11	0.17	1				

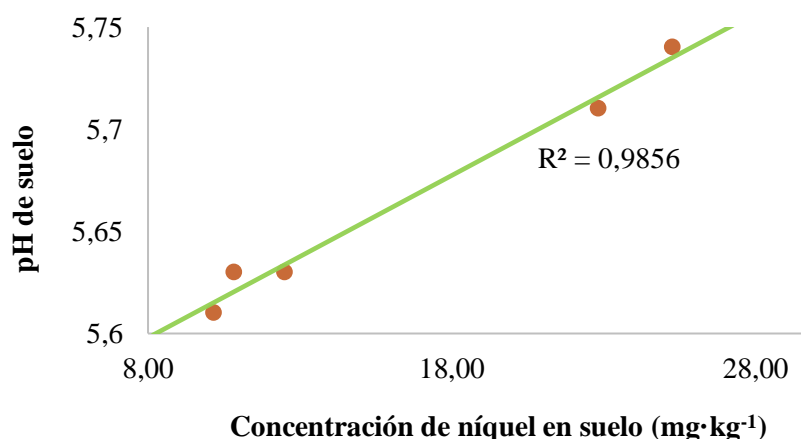
	pH Suelo	%MO Suelo	Cd Grano	Cd Suelo	Pb Grano	Pb Suelo	Ni Grano	Ni Suelo	As Grano	As Suelo
Ni Grano	0.20	-0.71	0.83	0.80	-0.49	0.32	1			
Ni Suelo	0.99*	-0.60	-0.33	-0.53	-0.38	0.32	0.09	1		
As Grano	0.36	-0.42	-0.46	-0.52	-0.66	-0.21	-0.29	0.43	1	
As Suelo	0.58	-0.22	-0.75	-0.64	-0.33	-0.49	-0.26	0.66	0.46	1

*Los valores son significativos a $p \leq 0.05$.

Se presentó una la correlación directa fuerte entre el pH y las concentraciones de Ni y en el suelo como se observa en la **Figura 9**, es decir, cuando aumenta el pH aumentan las concentraciones de Ni. Debido a coloides naturales (arcilla y materia orgánica) distribuidos en el suelo como según lo menciona **Wei et al. (2022)** puesto que, la adsorción de Ni^{2+} se ve afectada coloides del suelo en un aumento del 17% al 25% con el aumento del pH de 5.5 a 7.5. Al aumentar el pH, la cantidad de H^+ disminuye, lo que reduce la adsorción competitiva entre H^+ y Ni^{2+} en presencia de coloides del suelo. Además, la cantidad de cationes en los sitios de unión de los coloides del suelo también se reduce con pH altos; por lo tanto, el número de sitios negativos aumenta para contribuir a la adsorción de Ni^{2+} .

Figuras 9.

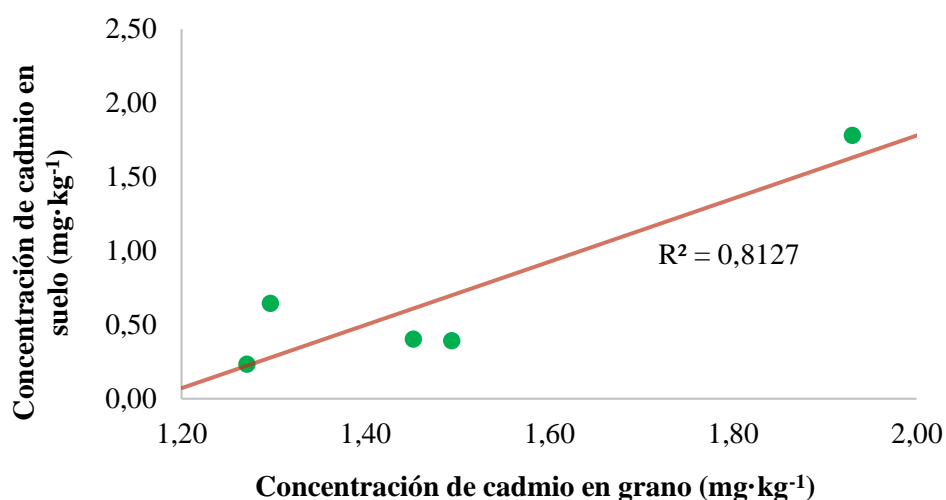
Coeficiente de correlación de Pearson entre el pH y concentración de níquel en el suelo.



Mientras que los demás metales no presentan correlación debido a que $\text{pH} < 6$ en el suelo, los metales pesados se liberarán de sus complejos aumentando su movilidad (Vanderschueren et al., 2021). Además, entre el pH y % de materia orgánica del suelo se presentó una correlación inversa fuerte, es decir, que cuando aumenta el pH se disminuye el % de materia orgánica. Como mencionan Zhou et al. (2019) el pH disminuye por la producción ácidos orgánicos desprendidos de la materia orgánica.

Figuras 10.

Coefficiente de correlación de Pearson entre las concentraciones de Cd en suelo y granos de cacao.



Las concentraciones de Cd en granos de cacao y suelo presentaron una correlación directa fuerte como se observa en la *Figura 10*; como lo han descrito varios estudios (Abt & Robin, 2020; Arévalo-Gardini et al., 2017). Al poseer idéntica carga y comportamiento químico al Ca^{2+} facilitando la absorción y acumulación de Cd en la planta como se mencionó anteriormente.

Tabla 24.

Rango de interpretación de los coeficientes de correlación de Pearson.

Intervalo de valores r_{xy}		Criterio de Correlación
Desde	Hasta	
± 0.00	± 0.10	Correlación Nula
± 0.11	± 0.30	Correlación Débil
± 0.31	± 0.50	Correlación Moderada
± 0.51	± 1.00	Correlación Fuerte

Mientras que las mismas presentaron correlaciones directas fuertes con la concentración de Ni en los granos; contradictorio al estudio presentado por **Romero-Estévez et al. (2019)** que determinó una correlación no lineal. Por otro lado, se presentó una correlación inversa fuerte entre la concentración de As del suelo y Cd en granos. A destacar, fue la correlación directa nula entre las concentraciones de Ni en el suelo y granos. Finalmente, se determinó una correlación directa fuerte entre el contenido de Ni y As en el suelo; misma relación que fue determinada por **Mahmud et al. (2021)** en suelos de plantaciones de arroz, siendo de potencial riesgo para la salud humana.

3.2. Verificación de Hipótesis

Se rechaza la hipótesis nula planteada. La concentración final de metales pesados en las muestras de suelo de la plantación cacaotera supera los límites máximos por la norma ambiental. De igual manera, los granos de cacao en plantación superan los límites máximos permisibles establecidos por las legislaciones nacionales e internacionales vigentes.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se cuantificó los parámetros físicos del suelo en la plantación cacaotera del sector San Jacinto del cantón Montalvo, caracterizándose en un moderado pH ácido, baja conductividad eléctrica, niveles óptimos de humedad y niveles mayores al 5% de materia orgánica, siendo apropiados para el manejo y cultivo del cacao; tomando en cuenta aumentar el pH a cercanos a pH 6.5 con el uso de cal dolomita. Mientras que los parámetros fisicoquímicos de granos frescos de cacao dentro de la plantación refirieron a un pH neutro, baja conductividad eléctrica, alto contenido de humedad y niveles óptimos de materia orgánica, mismos que son adecuados para su continuación en etapas de producción a derivados del cacao.
- Las concentraciones de metales pesados en el suelo de cada parcela muestreada en la plantación cacaotera presento diferencias por posibles contaminaciones puntuales. No obstante, la plantación alcanzó una media general de 0.69 ± 0.35 mgCd·kg⁻¹, 11.87 ± 2.17 mgPb·kg⁻¹, 16.32 ± 2.33 mgNi·kg⁻¹ y 13.80 ± 2.84 mgAs·kg⁻¹. Estos resultados reflejan mayoritariamente niveles normales para los cultivos de cacao en comparación a estudios similares en la región Litoral descritos en bibliografía. Por otro lado, las concentraciones de metales pesados en granos de cacao de cada parcela muestreada no demostraron diferencias, alcanzando una media general de 1.48 ± 0.34 mgCd·kg⁻¹, 0.72 ± 0.18 mgPb·kg⁻¹, 3.21 ± 0.46 mgNi·kg⁻¹ y 3.67 ± 0.73 mgAs·kg⁻¹, que refleja niveles de contaminación en la mayoría mismos que son influenciados por el pH, materia orgánica y metales presentes en el suelo.
- Se efectuó una comparación entre las concentraciones de metales pesados y LMP establecidos por la norma ambiental TULSMA. Determinado que las concentraciones Cd y As sobrepasan los LMP, mientras que las

concentraciones de Pb y Ni se encuentran por debajo del LMP. Con respecto a la concentración de Cd en granos de cacao, supera los LMP en normas de UE y EEUU. En el caso de las concentraciones de Ni y As, superan los LMP propuestos en las legislaciones de México, China, Indonesia, entre otros importadores de cacao y derivados, con el fin preservar la salud humana ante los metales pesados. Por otro lado, la concentración de Pb en el grano se mantiene por debajo del LMP establecidos en legislaciones de los países descritos.

- El suelo de cultivo de la plantación de cacao en el sector San Jacinto del cantón Montalvo de la provincia de Los Ríos, presentó contaminación de Cd y As, según la normativa ambiental. Por otro lado, en granos de cacao de la plantación se registró concentraciones de Cd, Ni y As superiores a normas internacionales, amenazando la sostenibilidad en la producción, transformación y comercialización de cacao, como también a la salud humana. Por tal motivo, a futuro es necesario desarrollar estudios acerca del flujo radicular de metales pesados en plantas de cacao, papel de la microbiota, propiedades fisicoquímicas, micro y macroelementos en el suelo, así como también el contenido de metales pesados en fertilizantes y pesticidas.
- Con base en los resultados obtenidos por el análisis de correlación de Pearson entre el pH, contenido de materia orgánica y concentración de metales pesados en suelo y granos de cacao. Se determinó que el pH del suelo está correlacionado con el contenido de Ni del suelo debido a coloides naturales (arcilla y materia orgánica) distribuidos en el suelo, que al aumento del pH tienden a la adsorción del Ni en mayor proporción como lo describen estudios. De la misma forma, la concentración de Cd del suelo está correlacionada con la concentración de Cd en granos de cacao debido a que el Cd en los minerales sustituye al Ca^{2+} , facilitando su absorción por parte de la planta.

4.2. Recomendaciones

- Emplear diferentes métodos de digestión ácida con respecto al uso de HNO_3 , HCl , HClO_4 o H_2SO_4 y sus volúmenes, acorde al tipo de muestra analizar para evitar residuos orgánicos que conlleven a interferencias en la determinación de metales pesados por medio del espectrofotómetro de absorción atómica.
- Determinar las concentraciones de metales pesados en el agua de riego utilizada en la plantación y a diferentes profundidades en el suelo, con el fin de conocer la existencia de relación alguna con la concentración de metales pesados en granos de cacao y el suelo analizado.
- Ampliar el estudio en analizar raíz, tallo, hojas, testa y mucilago de las pantas de cacao con respecto a las concentraciones de metales pesados, con la finalidad de conocer la movilidad de los mismos hasta llegar a los granos de cacao.
- Realizar una investigación más de campo que permita detallar posibles factores puntuales que afectan la alta disponibilidad de metales pesados en las parcelas de plantación de cacao, como lo son datos topográficos, descripciones detalladas del perfil del suelo, análisis de textura y nutrientes del suelo y uso de fertilizantes o pesticidas.
- Realizar estudios sobre las relaciones entre metales para determinar un sistema de remediación eficaz que combine árboles autóctonos, plantas herbáceas o acuáticas, biocarbón, bacterias y micorrizas arbusculares, entre otros, que reduzcan la presencia o disponibilidad de los metales pesados.

MATERIALES DE REFERENCIA

Bibliografía

- Abad, A., Acuña, C., & Naranjo, E. (2020). El cacao en la Costa ecuatoriana: estudio de su dimensión cultural y económica. *Estudios de La Gestión. Revista Internacional de Administración*, 7, 59–63. <https://doi.org/10.32719/25506641.2020.7.3>
- Abdulai, I., Vaast, P., Hoffmann, M. P., Asare, R., Jassogne, L., Van Asten, P., Rötter, R. P., & Graefe, S. (2018). Cocoa agroforestry is less resilient to sub-optimal and extreme climate than cocoa in full sun. *Global Change Biology*, 24(1), 273–286. <https://doi.org/10.1111/gcb.13885>
- Abt, E., & Robin, L. P. (2020). Perspective on Cadmium and Lead in Cocoa and Chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(46), 13008–13015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08295>
- Ackah, E., & Dompey, E. (2021). Effects of fermentation and drying durations on the quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during the rainy season in the Juaboso District of the Western-North Region, Ghana. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00634-7>
- Agrocalidad. (2018). *Muestreo para análisis de suelos INT/SFA/10*. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/agua8.pdf>
- Aguirre-Forero, S. E., Piraneque-Gambasica, N. V., & Vásquez-Polo, J. R. (2020). Heavy metals content in soils and cocoa tissues in Magdalena department Colombia: emphasis in cadmium. *Entramado*, 16(2), 298–310. <https://doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.6753>
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics*, 9(3), 1–34. <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>
- Alí, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and

- bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019, 14.
<https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
- Apriyanto, M. (2017). Analysis of Amino Acids in Cocoa Beans Produced during Fermentation by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 7(1), 25.
<https://doi.org/10.5958/2277-9396.2017.00003.4>
- Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & 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, 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>
- Argüello, D., & Chávez, E. (2021). *Guía 4: Muestreo de suelo, hojas y almendras para análisis de cadmio en cultivos de cacao. Caja de herramientas para la prevención y mitigación de la contaminación de cadmio en la cadena de cacao-Ecuador* (1st ed.). https://cefaecuador.org/wp-content/uploads/2022/05/Guia_4.pdf
- Argüello, D., Chavez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*, 649, 120–127.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>
- Arham, Z., Asmin, L. O., Rosmini, & Nurdin, M. (2017). Heavy metal content of cocoa plantation soil in East Kolaka, Indonesia. *Oriental Journal of Chemistry*, 33(3), 1164–1170. <https://doi.org/10.13005/ojc/330314>
- Arjomandi, M., & Shirkhanloo, H. (2019). A Review: Analytical methods for heavy metals determination in environment and human samples. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*, 2(3), 97–126.
<https://doi.org/10.24200/amecj.v2.i03.73>
- Arosemena, A. (2021). Estadísticas de Exportación. Boletín mensual de ANECACAO. *Anecacao*, 21, 1–8. <https://anecacao.com/index2022.html>
- Assa, A., Noor, A., Yunus, M. R., Misnawi, & Djide, M. N. (2018). Heavy metal concentrations in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) originating from East

- Luwu, South Sulawesi, Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, 979(1), 4–8. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/979/1/012011>
- Atiaga, O., Ruales, J., Nunes, L. M., & Otero, X. L. (2021). Toxic Elements in Soil and Rice in Ecuador. *Agronomy*, 11(8), 1594. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081594>
- ATSDR. (2021). *Toxic Substances Portal - Arsenic*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <https://wwwn.cdc.gov/tsp/substances/toxsubstance.aspx?toxid=3>
- Barraza, F., Schreck, E., Uzu, G., Lévêque, T., Zouiten, C., Boidot, M., & Maurice, L. (2021). Beyond cadmium accumulation: Distribution of other trace elements in soils and cacao beans in Ecuador. *Environmental Research*, 192, 110241. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110241>
- Barrezueta-Unda, S., Cervantes-Alava, A., Ullauri-Espinoza, M., Barrera-León, J., & Condoy-Gorotiza, A. (2020). Evaluación del método de ignición para determinar materia orgánica en suelos de la provincia el Oro-Ecuador. *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 19(2), 25–36. <https://doi.org/10.14409/fa.v19i2.9747>
- Batallas, M., Preciado, M., & Pesantez, F. (2021). Evaluación de cadmio y plomo en almendras de cacao por espectroscopia de absorción atómica. *Ciencia UNEMI*, 14(37), 49–59. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol14iss37.2021pp49-59p>
- Borgulat, J., Łukasik, W., Borgulat, A., Nadgórska-Socha, A., & Kandziora-Ciupa, M. (2021). Influence of lead on the activity of soil microorganisms in two Beskidy landscape parks. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193, 839. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09503-2>
- Brito-Vega, H., Salaya-Domínguez, J. M., Gómez-Méndez, E., Gómez-Vázquez, A., & Antele-Gómez, J. B. (2018). Physico-chemical properties of soil and pods (*Theobroma cacao* L.) in cocoa agroforestry systems. *Journal of Agronomy*, 17(1), 48–55. <https://doi.org/10.3923/ja.2018.48.55>
- Brunelle, S. (2020). Appendix P: Guidance for Soil Collection, Characterization, and Application for Biothreat Agent Detection Method and Site Evaluations. *Journal*

of *AOAC INTERNATIONAL*, 103(4), 873–881.
<https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa044>

Bundschuh, J., Armienta, M., Morales, N., Alam, M., López, D., Delgado, V., Dietrich, S., Schneider, J., Tapia, J., Sracek, O., Castillo, E., Parra, M., Altamirano, M., Guimarães, L., Sosa, N., Niazi, N., Tomaszewska, B., Lizama Allende, K., Bieger, K., & Ahmad, A. (2021). Arsenic in Latin America: New findings on source, mobilization and mobility in human environments in 20 countries based on decadal research 2010-2020. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(16), 1727–1865.
<https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1770527>

Caligiani, A., Marseglia, A., & Palla, G. (2016). Cocoa: Production, Chemistry, and Use. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., pp. 185–190). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00177-X>

Calle, Á. L. (2021). *Contaminación por agroquímicos y acumulación de cadmio y plomo en suelos dedicados a la producción de cacao del sector la isla recinto la resistencia en el cantón coronel Marcelino Maridueña* [Tesis de Maestría, Univesidad Técnica Estatal de Quevedo]. Repositorio Institucional - Univesidad Técnica Estatal de Quevedo

Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *The Science of the Total Environment*, 533, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>

Diario Oficial de la Federación México. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2013. Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba. In *Segob* (Vol. 64). https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5332832&fecha=17/02/2014#gsc.tab=0

Dradrach, A., Karczewska, A., Szopka, K., & Lewińska, K. (2020). Accumulation of Arsenic by Plants Growing in the Sites Strongly Contaminated by Historical

Mining in the Sudetes Region of Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(9), 3342. <https://doi.org/10.3390/ijerph17093342>

Environmental Agency Protection EPA. (2007). *Method 3015A: Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils, and Oils*. <https://www.epa.gov/esam/us-epa-method-3051a-microwave-assisted-acid-digestion-sediments-sludges-and-oils>

Figuroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, Z. J., González-Ríos, O., Cocolin, L., & Suárez-Quiroz, M. L. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>

García-Briones, A. R., Pico-Pico, B. F., & Jaimez, R. E. (2021). La cadena de producción del Cacao en Ecuador: Resiliencia en los diferentes actores de la producción. *Novasinergia*, 4(2), 152–172. <https://doi.org/10.37135/ns.01.08.10>

García, M. B., & Valdéz, J. D. (2019). *Evaluación in situ de las propiedades químicas del suelo y su relación con algunas especies nativas del pastizal halofítico en la Pampa Deprimida* [Tesis de grado, Universidad Nacional de La Plata]. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/73662>

Gardea, A. A., García-Bañuelos, M. L., Orozco-Avitia, J. A., Sánchez-Chávez, E., Sastré-Flores, B., & Ávila-Quezada, G. (2017). Cacao (*Theobroma cacao* L.). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, 2, 921–940. <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch43>

Gil, J. P., López-Zuleta, S., Quiroga-Mateus, R. Y., Benavides-Erazo, J., Chaali, N., & Bravo, D. (2022). Cadmium distribution in soils, soil litter and cacao beans: a case study from Colombia. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(4), 2455–2476. <https://doi.org/10.1007/S13762-021-03299-x/tables/5>

Guerrero, G. (2019). *El Cacao ecuatoriano. Su historia empezó antes del siglo XV*. Revista Líderes. <https://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano->

historia-empezo-siglo.html

- Hassan, M., Chattha, M., Khan, I., Chattha, M. B., Aamer, M., Nawaz, M., Ali, A., Khan, M. A. U., & Khan, T. A. (2019). Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities-a review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(13), 12673–12688. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-04892-x>
- Hernández, D., Espinosa, J., Peñaloza, M., Rodríguez, J., Chacón, J., Toloza, C., Arenas, M., Carrillo, S., & Bermúdez, V. (2018). Sobre el uso adecuado del coeficiente de correlación de Pearson: definición, propiedades y suposiciones. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 37(5), 587–595. <https://doi.org/0000-0001-6768-1873>
- Ikegwu, O. J. (2021). Effect of moisture and temperature on thermal conductivity of pigeon pea seeds. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 23(1), 217–224. <https://cigrjournal.org/index.php/Ejournal/article/view/6065>
- Indiarto, R., Subroto, E., Sukri, N., & Djali, M. (2021). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans processing technology: A review of flavonoid changes. *Asian Journal of Plant Sciences*, 20(4). <https://doi.org/10.3923/ajps.2021.684.693>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. (2010). *NTE INEN 621:2010 Chocolates. Requisitos.* <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/621.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. (2015). *NTE INEN 173: Cacao en Grano. Determinación de La Humedad.* <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/173.pdf>
- Intriago, F., Talledo, M., Barberán, J., & Flores, J. (2021). Origin and Spatial Distribution of Cadmio in Farms Cacaoteras in the Province of Manabí, Ecuador. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(6), 15142–15151. <https://www.annalsofrscb.ro/index.php/journal/article/view/8558>
- Jaimez, R. E., Barragan, L., Fernández, M., Wessjohann, L. A., Cedeño, G., Cantos, I., & Arteaga, F. (2022). *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: A comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and

physiological aspects. *PeerJ Computer Science*, 10, e12676.
<https://doi.org/10.7717/peerj.12676/fig-3>

Jakubus, M., & Graczyk, M. (2020). Availability of Nickel in Soil Evaluated by Various Chemical Extractants and Plant Accumulation. *Agronomy*, 10(11), 1805.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10111805>

Jan, S., & Parray, J. A. (2016). Heavy Metal Uptake in Plants. *Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants*, 1–18. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1693-6_1

Jimenez, J. C., Amores, F. M., Solórzano, E. G., Rodríguez, G. A., La Mantia, A., Blasi, P., & Llor, R. G. (2018). Differentiation of Ecuadorian National and CCN-51 cocoa beans and their mixtures by computer vision. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2824–2829. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8790>

Kayode, O. T., Aizebeokhai, ; A P, & Odukoya, A. M. (2021). Arsenic in agricultural soils and implications for sustainable agriculture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 655(1), 1755–1315. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/655/1/012081>

Kruszewski, B., Obiedziński, M. W., & Kowalska, J. (2018). Nickel, cadmium and lead levels in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.012>

Kubier, A., Wilkin, R. T., & Pichler, T. (2019). Cadmium in soils and groundwater: A review. *Applied Geochemistry*, 108, 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.104388>

Kumar, O., Singh, S. K., Singh, A. P., Yadav, S. N., & Latore, A. M. (2017). Effect of soil application of nickel on growth, micronutrient concentration and uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Inceptisols of Varanasi. *Journal of Plant Nutrition*, 41(1), 50–66. <https://doi.org/10.1080/01904167.2017.1381724>

Lan, M. M., Liu, C., Liu, S. J., Qiu, R. L., & Tang, Y. T. (2020). Phytostabilization of Cd and Pb in Highly Polluted Farmland Soils Using Ramie and Amendments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1661. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051661>

- Lawrence, P. G., Roper, W., Morris, T. F., & Guillard, K. (2020). Guiding soil sampling strategies using classical and spatial statistics: A review. *Agronomy Journal*, *112*(1), 493–510. <https://doi.org/10.1002/agj2.20048>
- Leclercq, A., Nonell, A., Todolí Torró, J. L., Bresson, C., Vio, L., Vercouter, T., & Chartier, F. (2015). Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations. *Analytica Chimica Acta*, *885*, 57–91. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.039>
- Loo Miranda, J. L. M. (2022). *Variación de la conductividad eléctrica del medio acuoso por inmersión de granos de cacao CCN-51 con diferentes índices de fermentación* [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio Institucional – Universidad Nacional Agraria
- Loo Miranda, J. L. M., Chire Fajardo, G. C., & Ureña Peralta, M. O. (2020). Modeling of the variation of the electrical conductivity of the leachate of cocoa with different fermentation. *Enfoque UTE*, *11*(3), 46–54. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v11n3>
- Mahmud, U., Tareq, M., Salam, B., Abu, ., Khan, S., & Rahman, M. M. (2021). Ecological risk of heavy metal in agricultural soil and transfer to rice grains. *Discover Materials*, *1*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S43939-021-00010-2>
- Martinez, M. V, Coneo Rodriguez, R., Bruno, M. M., Kayode, O. T., Aizebeokhai, ; A P, & Odukoya, A. M. (2021). Arsenic in agricultural soils and implications for sustainable agriculture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *655*(1), 012081. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/655/1/012081>
- Mendoza, L., Vera, V., Giler, J. M., & Simbaña, K. (2022). Características fisicoquímicas de suelos de uso agrícola y forestal. Caso: San Pablo de Tarugo, Chone – Ecuador. *Revista Científica de Ciencias Naturales y Ambientales*, *16*(1), 334–341. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8539723&info=resumen&idoma=SPA>
- Meter, A., Atkinson, R., & Labiberte, B. (2019). *Cadmio en el cacao de América*

Latina y el Caribe: Análisis de la Investigación y Soluciones Potenciales para la Mitigación. CAF. <http://scioteca.caf.com/handle/123456789/1505>

Ministerio del Ambiente. (2015). *Acuerdo Ministerial Registro Oficial Edición Especial N°387 Anexo 2 del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados*. [https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-](https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento_Registro-Oficial-No-387-04-noviembre-2015_0.pdf)

[09/Documento_Registro-Oficial-No-387-04-noviembre-2015_0.pdf](https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento_Registro-Oficial-No-387-04-noviembre-2015_0.pdf)

Morales, J. F., & Serrano, V. C. (2019). *Cuantificación del servicio ecosistémico de almacenamiento de carbono en el suelo de los ecosistemas Bosque Siempre-Verde de Tierras Bajas, Bosque Siempre-Verde de Pie de Monte y Bosque Siempre-Verde Andino Montano Bajo de la provincia del Napo*. [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/16960>

Neira, J., Ruperty, J., & Sánchez, J. (2021). *Estudio del contenido de metales pesados en cacao (*Theobroma cacao* L.) y su incidencia en la calidad de acuerdo a normativas internacionales considerando su procedencia, tipos y transformación* [Tesis de grado, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/6466>

Niether, W., Schneidewind, U., Armengot, L., Adamtey, N., Schneider, M., & Gerold, G. (2017). Spatial-temporal soil moisture dynamics under different cocoa production systems. *CATENA*, *158*, 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.07.011>

Nnuro, W. A., Amankwaah, D., Awudza, J. A. M., & Afful, S. (2020). Assessment of Heavy Metals and Proximate Analysis of Cocoa Beans from Selected Cocoa Growing Areas in Ghana. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry*, *21*(14), 36–46. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2020/v21i1430245>

Novillo Espinoza, I. D., Carrillo Zenteno, M. D., Cargua Chavez, J. E., Nabel Moreiral, V., Albán Solarte, K. E., & Morales Intriago, F. L. (2018). Propiedades físicas del suelo en diferentes sistemas agrícolas en la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Temas Agrarios*, *23*(2), 177–187. <https://doi.org/10.21897/rta.v23i2.1301>

- Okerefor, U., Makhatha, M., Mekuto, L., Uche-Okerefor, N., Sebola, T., & Mavumengwana, V. (2020). Toxic Metal Implications on Agricultural Soils, Plants, Animals, Aquatic life and Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7), 2204. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072204>
- Oorts, K., Smolders, E., Lanno, R., & Chowdhury, M. J. (2021). Bioavailability and Ecotoxicity of Lead in Soil: Implications for Setting Ecological Soil Quality Standards. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(7), 1948–1961. <https://doi.org/10.1002/etc.5051>
- Otero, X. L., Tierra, W., Atiaga, O., Guanoluiza, D., Nunes, L. M., Ferreira, T. O., & Ruales, J. (2016). Arsenic in Rice Agrosystems (Water, Soil and Rice Plants) in Guayas and Los Rios Provinces, Ecuador. *Science of the Total Environment*, 573, 778–787. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.162>
- Oumenskou, H., El Baghdadi, M., Barakat, A., Aquit, M., Ennaji, W., Karroum, L. A., & Aadraoui, M. (2018). Assessment of the heavy metal contamination using GIS-based approach and pollution indices in agricultural soils from Beni Amir irrigated perimeter, Tadla plain, Morocco. *Arabian Journal of Geosciences* 2018 11:22, 11(22), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S12517-018-4021-5>
- Paredes, R. (2022). *Plan de negocio para la creación de un centro de acopio de cacao en el cantón Montalvo, provincia de Los Ríos*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8794>
- Peláez, P., Guerra, S., & Contreras, D. (2016). Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes. *Scientia Agropecuaria*, 7(2), 111–119. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.02.04>
- PG Instruments. (2014). *Analytical Cookbook Flame and Graphite Analysis*.
- Reis, G. S., De Almeida, A. A., De Almeida, N. M., De Castro, A. V., Mangabeira, P. A., & Pirovani, C. P. (2015). Molecular, Biochemical and Ultrastructural Changes Induced by Pb Toxicity in Seedlings of *Theobroma cacao* L. *PLoS One*, 10(7), e0129696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129696>

- Rodríguez-Velázquez, N. D., Chávez-Ramírez, B., Gómez de la Cruz, I., Vásquez-Murrieta, M.-S., & Estrada de los Santos, P. (2022). El cultivo del cacao, sus características y su asociación con microorganismos durante la fermentación. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 7(25), 36–51. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6326782>
- Romero-Estévez, D., Yáñez-Jácome, G. S., Simbaña-Farinango, K., & Navarrete, H. (2019). Content and the relationship between cadmium, nickel, and lead concentrations in Ecuadorian cocoa beans from nine provinces. *Food Control*, 106, 106750. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106750>
- SEMARNAT. (2002). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. In *Diario Oficial de la Federación*. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=717582&fecha=31/12/2002
- The European Commission. (2014). Commission Regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs Text with EEA relevance. *Official Journal*, 138, 75–79. <https://doi.org/data.europa.eu/eli/reg/2014/488/oj>
- Uriña, A. (2022). *Análisis de Metales Pesados, Cadmio y Plomo, en el suelo de Cultivo de Banano (Musa Paradisiaca), en la Hacienda “Chaparral”, Cantón Balzar* [Tesis de grado, Universidad Agraria del Ecuador]. [https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/URIÑA COELLO VICTOR ARIEL.pdf](https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/URIÑA%20COELLO%20VICTOR%20ARIEL.pdf)
- USDA Foreign Agricultural Service. (2018). *China Releases the Standard for Maximum Levels of Contaminants in Foods*. [https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=China Releases the Standard for Levels of Contaminants in Foods _Beijing_China - Peoples Republic of_5-9-2018.pdf](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=China%20Releases%20the%20Standard%20for%20Levels%20of%20Contaminants%20in%20Foods%20_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_5-9-2018.pdf)
- van Vliet, J. A., & Giller, K. E. (2017). Mineral Nutrition of Cocoa: A Review. *Advances in Agronomy*, 141, 185–270. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2016.10.017>

- Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J. L., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., & Smolders, E. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of the Total Environment*, 781, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>
- Vanisree, C., Mahipal Singh, S., Prashant, S., Ekta, J., Verma, R. K., Awasthi, K. K., Awasthi, G., & Nagar, V. (2022). Environmental Impact and Remediation of Heavy Metals. In H. M. Saleh & A. I. Hassan (Eds.), *Environmental Impact and Remediation of Heavy Metals*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97895>
- Velasqu ez, J. (2020). *Sustentabilidad de Fincas Productoras de Cacao Nacional y CCN51 en la Provincia de Los Ríos en los cantones (Babahoyo, Montalvo, Ventanas)* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/8222>
- Wahyuni, M. F., Yunita, D., Yusriana, Y., Aisyah, Y., Lahmer, R. A., & Mugampoza, D. (2018). Chemical and Microbiological characteristics of cocoa beans from pidie district, Aceh province, Indonesia. *Proceeding of AIC: Health and Life Sciences*, 8(1), 113–121. <https://jurnal.unsyiah.ac.id/aic-hls/article/view/12856>
- Wei, Z., Zhu, Y., Wang, Y., Song, Z., Wu, Y., Ma, W., Hou, Y., Zhang, W., & Yang, Y. (2022). Influence of Soil Colloids on Ni Adsorption and Transport in the Saturated Porous Media: Effects of pH, Ionic Strength, and Humic Acid. *Applied Sciences*, 12(13), 6591. <https://doi.org/10.3390/app12136591>
- Zhang, J., Hamza, A., Xie, Z., Hussain, S., Brestic, M., Tahir, M. A., Ulhassan, Z., Yu, M., Allakhverdiev, S. I., & Shabala, S. (2021). Arsenic transport and interaction with plant metabolism: Clues for improving agricultural productivity and food safety. *Environmental Pollution*, 290, 117987. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117987>
- Zhang, X., Yan, L., Liu, J., Zhang, Z., & Tan, C. (2019). Removal of Different Kinds of Heavy Metals by Novel PPG-nZVI Beads and Their Application in Simulated Stormwater Infiltration Facility. *Applied Sciences*, 9(20), 4213.

<https://doi.org/10.3390/app9204213>

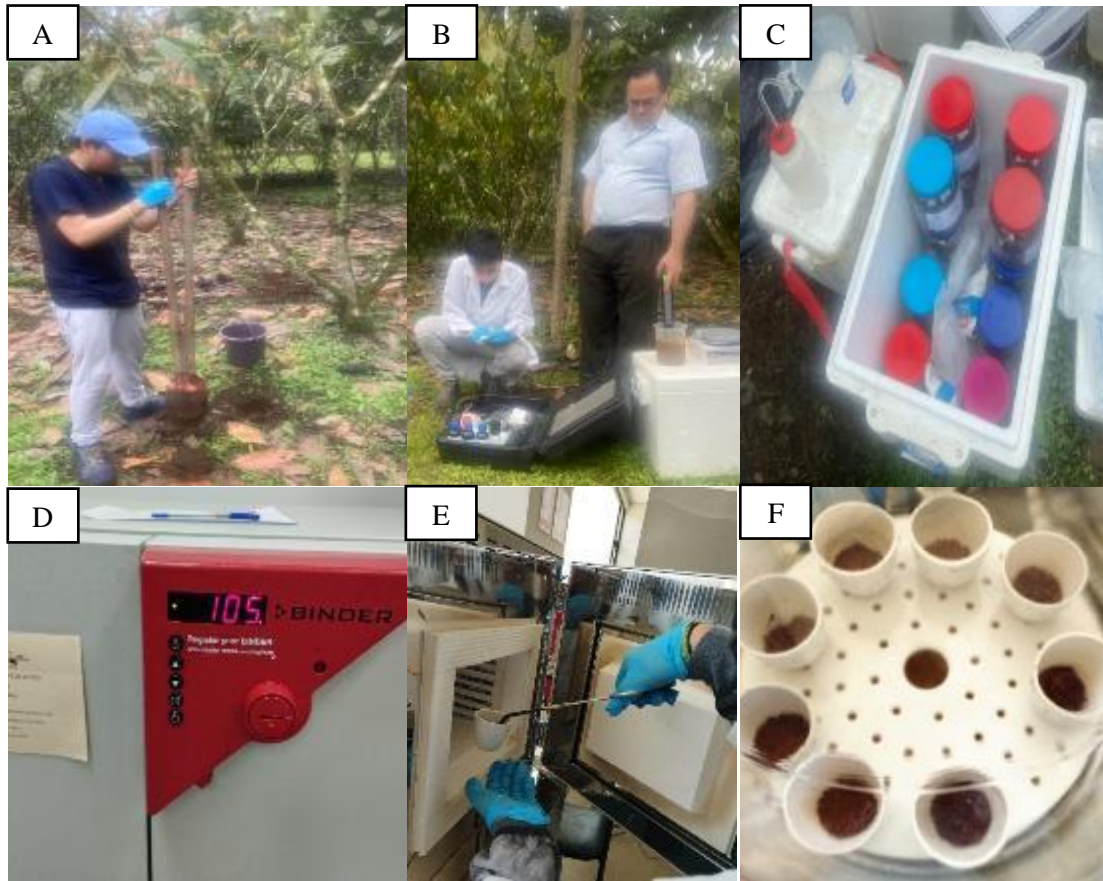
Zhou, W., Han, G., Liu, M., & Li, X. (2019). Effects of soil pH and texture on soil carbon and nitrogen in soil profiles under different land uses in Mun River Basin, Northeast Thailand. *PeerJ*, 7, e7880. <https://doi.org/10.7717/peerj.7880>

Zulfiqar, U., Jiang, W., Xiukang, W., Hussain, S., Ahmad, M., Maqsood, M. F., Ali, N., Ishfaq, M., Kaleem, M., Haider, F. U., Farooq, N., Naveed, M., Kucerik, J., Brtnicky, M., & Mustafa, A. (2022). Cadmium Phytotoxicity, Tolerance, and Advanced Remediation Approaches in Agricultural Soils; A Comprehensive Review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 773815. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.773815>

Anexos

Anexo 1.

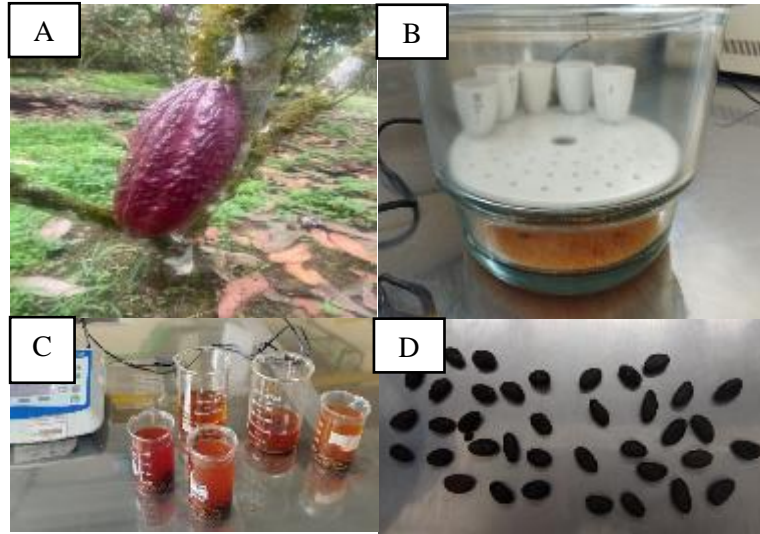
Muestreo y medición de parámetros fisicoquímicos en muestras de suelo de plantación cacaotera.



Nota. A. Excavación a profundidad 20 cm en suelo de plantación de cacao. B. Medición de pH y conductividad eléctrica en muestras. C conservación y refrigeración de muestras. D. Determinación de contenido de humedad. E. Determinación de % de materia orgánica. F. Muestras secas de suelo.

Anexo 2.

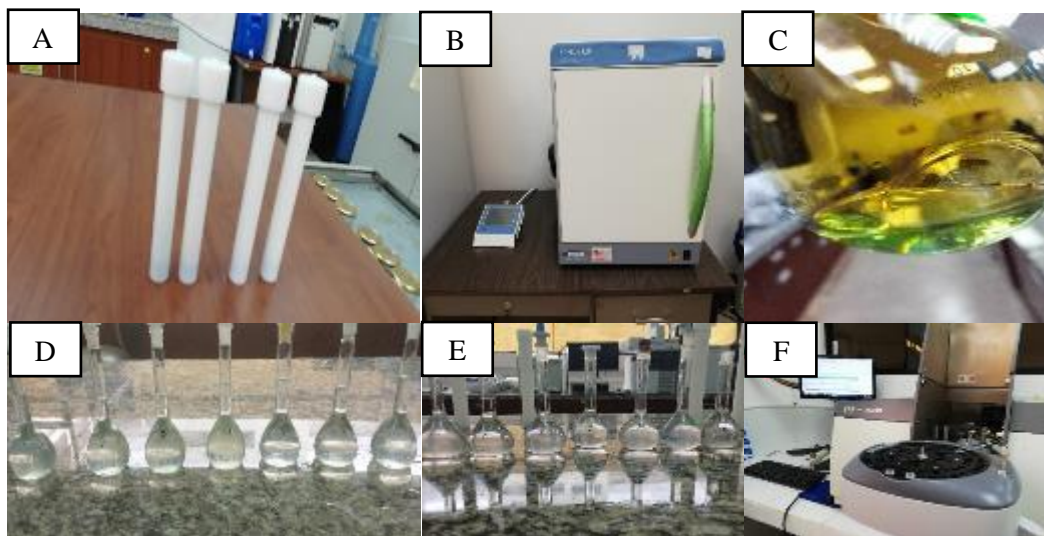
Muestreo y medición de parámetros fisicoquímicos en muestras de granos de cacao de plantación cacaotera.



Nota. A. Muestreo de mazorcas de cacao en la plantación. B. Determinación de humedad y % de materia orgánica. C. Medición de pH y conductividad eléctrica en muestras. D. Granos de cacao

Anexo 3.

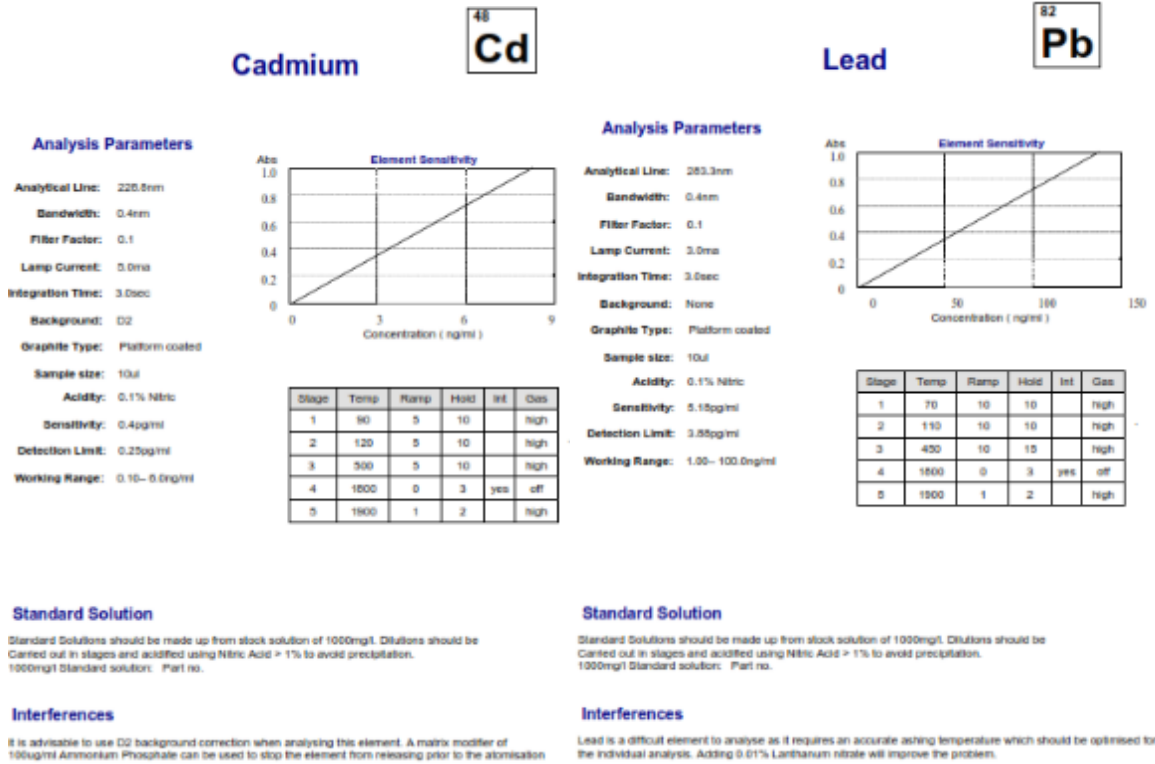
Proceso de digestión acida y medición de concentraciones de metales por medio del equipo de EAA con horno de grafito.



Nota. A. Preparación de muestras antes de digestión en vasos de teflón con 0.5 de muestra seca, 5 mL de HNO_3 y 1 mL de H_2O_2 . B. Sistema de digestión por microondas ETHOS UP MILESTONE. C. Muestra acabada la digestión. D. Muestras aforadas luego de digestión. E. Preparación de soluciones a diferente concentración del metal para la creación de curvas de calibración. F. Medición de metales en muestras por medio del equipo de EAA con horno de grafito.

Anexo 4.

Parámetros para la elaboración de la curva de calibración de Cd y Pb.



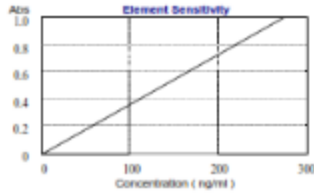
Anexo 5.

Parámetros para la elaboración de la curva de calibración de Ni y As.

Nickel 28 Ni

Analysis Parameters

Analytical Line: 232.0nm
Bandwidth: 0.2nm
Filter Factor: 0.1
Lamp Current: 4.0ma
Integration Time: 3.0sec
Background: D2
Graphite Type: Platform cooled
Sample size: 10ul
Acidity: 0.1% Nitric
Sensitivity: 0.07µg/ml
Detection Limit: 0.07µg/ml
Working Range: 1.00–150.0mg/ml



Stage	Temp	Ramp	Hold	Inl	Gas
1	50	5	10		High
2	110	10	15		High
3	600	15	10		High
4	2000	0	3	yes	off
5	2100	1	2		High

Standard Solution

Standard Solutions should be made up from stock solution of 1000mg/l. Dilutions should be Carried out in stages and acidified using Nitric Acid > 1% to avoid precipitation.
 1000mg/l Standard solution: Part no.

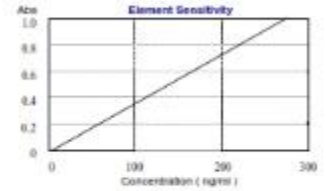
Interferences

There are no major interferences with this element.

Arsenic 33 As

Analysis Parameters

Analytical Line: 193.7nm
Bandwidth: 0.4nm
Filter Factor: 0.1
Lamp Current: 0.0ma
Integration Time: 3.0sec
Background: D2
Graphite Type: Platform cooled
Sample size: 10ul
Acidity: 0.1% Nitric
Sensitivity: 22.50µg/ml
Detection Limit: 17.15µg/ml
Working Range: 3.00–200mg/ml



Stage	Temp	Ramp	Hold	Inl	Gas
1	70	10	10		High
2	110	10	10		High
3	1200	10	10		High
4	2000	0	3	yes	off
5	2200	1	2		High

Standard Solution




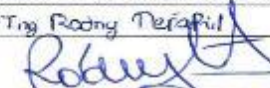

Standard Solutions should be made up from stock solution of 1000mg/l. Dilutions should be Carried out in stages and acidified using Nitric Acid > 1% to avoid precipitation.
 1000mg/l Standard solution: Part no.

Interferences

A matrix modifier should be added to the solutions to act as releasing agent, 55µg/ml of Nickel Nitrate can be made up as the matrix modifier. Palladium can be also used as a modifier but the ashing temperature should be increased by approximately 250°.




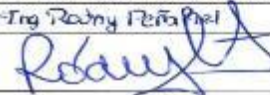
Anexo 6.

Cadena de custodia en el muestreo de suelo de cultivo de cacao.

		CADENA DE CUSTODIA MUESTREO DE SUELO DE CACAO							
		UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO/FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA							
LUGAR MONITOREO		Finca "La Esperanza"		DIRECCIÓN		Montalvo			
PROVINCIA		LOS RIOS		CANTÓN		Montalvo			
RESPONSABLE DEL LUGAR		MARIA IZQUIETA		TELÉFONO		0986374613			
MUESTRA	CÓDIGO DE MUESTRA	COORDENADAS	FECHA	HORA	PARÁMETROS IN SITU		DETERMINACIONES EN EL LABORATORIO		
					PH	CONDUCTIVIDAD (us/cm)	% HUMEDAD	% MATERIA ORGÁNICA	METALES PESADOS (Cd, As, Pb, Ni)
1	UTA-FCIAB-SC-M ₁ R ₁	1°44'37.4" S	15/10/22	09:45	5.61	22	X		X
	UTA-FCIAB-SC-M ₁ R ₂	79°15'55.0 W	15/10/22	10:00	5.62	23		X	X
	UTA-FCIAB-SC-M ₁ R ₃		15/10/22	10:10	5.61	22	X		X
2	UTA-FCIAB-SC-M ₂ R ₁	1°47'39.9" S	15/10/22	10:45	5.68	18	X		X
	UTA-FCIAB-SC-M ₂ R ₂	79°15'54.4 W	15/10/22	10:55	5.63	19		X	X
	UTA-FCIAB-SC-M ₂ R ₃		15/10/22	11:10	5.62	18	X		X
3	UTA-FCIAB-SC-M ₃ R ₁	1°47'36.8" S	15/10/22	11:25	5.62	22	X		X
	UTA-FCIAB-SC-M ₃ R ₂	79°15'52.7 W	15/10/22	11:30	5.61	21		X	X
	UTA-FCIAB-SC-M ₃ R ₃		15/10/22	11:40	5.63	21	X		X
4	UTA-FCIAB-SC-M ₄ R ₁	1°47'35.8" S	15/10/22	12:10	5.72	19	X		X
	UTA-FCIAB-SC-M ₄ R ₂	79°15'56.8 W	15/10/22	12:20	5.74	19		X	X
	UTA-FCIAB-SC-M ₄ R ₃		15/10/22	12:40	5.71	20	X		X
5	UTA-FCIAB-SC-M ₅ R ₁	1°47'35.8" S	15/10/22	13:00	5.73	15	X		X
	UTA-FCIAB-SC-M ₅ R ₂	79°15'52.8 W	15/10/22	13:20	5.73	14		X	X
	UTA-FCIAB-SC-M ₅ R ₃		15/10/22	13:45	5.74	14	X		X
TÉCNICO RESPONSABLE DE LA TOMA DE MUESTRAS			TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN			PROPIETARIO DEL LUGAR DE MUESTREO			
NOMBRE	Ostz Albin		NOMBRE	Dr. Ing. Rodney Perafán		NOMBRE	MARIA IZQUIETA		
FIRMA			FIRMA			FIRMA			

Anexo 7.

Cadena de custodia en el muestreo de mazorcas de cacao.

		CADENA DE CUSTODIA MUESTREO DE MAZORCAS DE CACAO							
LUGAR MONITOREO PROVINCIA RESPONSABLE DEL LUGAR		Finca "La Esperanza" Los Ríos Mario Izurieta		DIRECCIÓN CANTÓN TELÉFONO		Montalvo Montalvo 098 637 9619			
MUESTRA	CÓDIGO DE MUESTRA	COORDENADAS	FECHA	HORA	PARÁMETROS IN SITU		DETERMINACIONES EN EL LABORATORIO		
					PH	CONDUCTIVIDAD (uS/cm)	% HUMEDAD	% MATERIA ORGÁNICA	METALES PESADOS (Cd, As, Pb, Ni)
1	UTA-FCIAB-MC-M ₁ R ₁	1° 47' 32.4" S	15/10/22	14:30	en	laboratorio	X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₁ R ₂	74° 15' 55.0" W	15/10/22	14:30			X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₁								
2	UTA-FCIAB-MC-M ₂ R ₁	1° 47' 34.9" S	15/10/22	14:45			X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₂ R ₂	74° 15' 54.4" W	15/10/22	14:45			X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₂								
3	UTA-FCIAB-MC-M ₃ R ₁	1° 47' 36.8" S	15/10/22	15:00			X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₃ R ₂	74° 15' 53.9" W	15/10/22	15:00			X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₃								
4	UTA-FCIAB-MC-M ₄ R ₁	1° 47' 35.8" S	15/10/22	15:00			X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₄ R ₂	74° 15' 56.8" W	15/10/22	15:00			X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₄								
5	UTA-FCIAB-MC-M ₅ R ₁	1° 47' 35.3" S	15/10/22	15:15			X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₅ R ₂	74° 15' 52.8" W	15/10/22	15:15			X	X	X
	UTA-FCIAB-MC-M ₅								
TÉCNICO RESPONSABLE DE LA TOMA DE MUESTRAS			TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN			PROPIETARIO DEL LUGAR DE MUESTREO			
NOMBRE	Ostiz Albán		NOMBRE	Dr. Ing. Raimy Peña Pineda		NOMBRE	Mario Izurieta		
FIRMA			FIRMA			FIRMA	