



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

VOLTAMETRÍA DE ONDA CUADRADA PARA DETERMINAR CADMIO
EN ALMENDRAS DE CACAO (THEOBROMA CACAO): NACIONAL E
INJERTO DEL CANTÓN SANTA ROSA

CABRERA VILLON DIANA CAROLINA
INGENIERA QUÍMICA

TORRES REYES JONATHAN JAIR
INGENIERO QUÍMICO

MACHALA
2021



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

VOLTAMETRÍA DE ONDA CUADRADA PARA DETERMINAR
CADMIO EN ALMENDRAS DE CACAO (THEOBROMA CACAO):
NACIONAL E INJERTO DEL CANTÓN SANTA ROSA

CABRERA VILLON DIANA CAROLINA
INGENIERA QUÍMICA

TORRES REYES JONATHAN JAIR
INGENIERO QUÍMICO

MACHALA
2021



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

VOLTAMETRÍA DE ONDA CUADRADA PARA DETERMINAR CADMIO EN
ALMENDRAS DE CACAO (THEOBROMA CACAO): NACIONAL E INJERTO DEL
CANTÓN SANTA ROSA

CABRERA VILLON DIANA CAROLINA
INGENIERA QUÍMICA

TORRES REYES JONATHAN JAIR
INGENIERO QUÍMICO

ROMERO BONILLA HUGO ITALO

MACHALA, 18 DE DICIEMBRE DE 2020

MACHALA
2020

Trabajo Titulacion

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.unas.edu.pe

Fuente de Internet

1%

2

azdoc.tips

Fuente de Internet

<1%

3

www.biotechveg.com

Fuente de Internet

<1%

4

repositorio.upt.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

5

es.slideshare.net

Fuente de Internet

<1%

6

repositorio.ucv.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

7

UNIVERSIDAD ESTATAL DEL SUR DE MANABÍ. "VI CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍAS: "INGENIERÍA PARA FORMAR UNA SOCIEDAD SOSTENIBLE"", Editorial Internacional Runaiki, 2019

Publicación

<1%

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, CABRERA VILLON DIANA CAROLINA y TORRES REYES JONATHAN JAIR, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado VOLTAMETRÍA DE ONDA CUADRADA PARA DETERMINAR CADMIO EN ALMENDRAS DE CACAO (THEOBROMA CACAO): NACIONAL E INJERTO DEL CANTÓN SANTA ROSA, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 18 de diciembre de 2020

Diana Cabrera

CABRERA VILLON DIANA CAROLINA
0705810158

Jair Torres

TORRES REYES JONATHAN JAIR
0706451721

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico a mis padres, mis abuelitos y hermanos, por su amor y esfuerzo, me enseñaron valores y principios, motivo por cuál les debo la persona que soy actualmente, me apoyaron incondicionalmente, me motivaron a ser mejor cada día para alcanzar mis anhelos.

Diana Cabrera Villón

Este trabajo es dedicado principalmente a Dios quien me ha brindado salud y sabiduría para llegar a este tan importante de mi formación profesional, también a mi madre y padre quienes fueron pilar fundamental de responsabilidad y dedicación para poderme dar una profesión y ser mejor cada día cumpliendo todas mis metas propuestas.

Jonathan Torres Reyes

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por mantenerme perseverante hasta alcanzar mis metas, a mis padres por ser los pilares fundamentales de mi vida, en especial a mi mamá Diana Villón Solórzano, quien ha sido mi fuerza de cada día, a mis docentes que a lo largo de mi trayectoria académica me han ayudado a formarme como profesional y a mis compañeros por los buenos y malos momentos, me enseñaron el valor del trabajo en equipo y a quienes considerar amigos.

Diana Cabrera Villón

Agradezco en primer lugar a Dios por cuidarme y darme fuerzas para poder superar las adversidades que nos pone la vida, a mi madre que sin su apoyo estricto para realizar mis obligaciones de la mejor manera quien ha estado pendiente todo un siempre en mis estudios, a mi padre quien se ha esforzado todo un siempre para apoyarme en la realización de mis proyectos sin descanso alguno y a mi hermano quien también me ha impulsado a que termine mi carrera profesional.

Jonathan Torres Reyes

RESUMEN

El cultivo de Cacao tiene gran importancia económica, social y ambiental, estableciéndose como una materia prima reconocida en mercados internacionales, para el Ecuador representa una de las actividades de mayor relevancia después del banano, ya que es esencial como materia prima para la producción de chocolate de alta calidad, razón por la cual productores y exportadores se han preocupado por controlar que los productos derivados de Cacao no presente grados de toxicidad, con respecto a metales pesados como cadmio que se acumula en las almendras, representando una amenaza para la salud del consumidor, ya que la acumulación excesiva de este metal puede llevar a la formación de cálculos renales, neumonitis aguda con edema pulmonar lo cual contribuye al desarrollo de cáncer de pulmón.

Por ello el presente estudio se fundamenta en la validación y desarrollo de una técnica voltamperométrica por Voltametría de Onda Cuadrada (SWV) para la determinación y cuantificación de cadmio en almendras de dos variedades de cacao; nacional e injerto proveniente de dos fincas ubicadas en el Cantón Santa Rosa, donde se realizan actividades metalúrgicas que generan residuos de metales pesados como el cadmio, provocando contaminación del recurso hídrico, el río Santa Rosa, el cual se utiliza para el riego de los cultivos de cacao, originando índices de contaminación en su contenido.

Para el análisis de almendras de cacao se realizó un muestreo aleatorio de las mazorcas de cacao, luego un cuarteo para tomar una muestra representativa y posteriormente se trasladó al laboratorio para el respectivo secado en una estufa a 75°C durante un día, a las muestras secas se les quita la cascarilla y con ayuda de un mortero se tritura las semillas, se procede con la calcinación en crisoles a 400°C durante 8 horas, luego se trasladado a un desecador para que se enfríe y se sometió al proceso de digestión ácida, finalmente para el análisis voltamétrico se establecieron parámetros de validación como: precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, obteniendo resultados satisfactorios, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9987$. Se utilizó un electrodo de teflón con punta de Oro en medio electrolítico de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M con un pH 2.4, aplicando parámetros de: $f = 60\text{Hz}$; $\Delta E_p = 60\text{mV}$; $\Delta E_s = 50\text{mV}$, considerados los más óptimos para la técnica de SWV.

Por consiguiente, se obtuvieron niveles de concentración de cadmio de 0.30 ppm en cacao nacional y 0.27 ppm en cacao injerto en la finca 1, mientras que en la finca 2 se

encontraron concentraciones de 0.14 ppm en cacao nacional y 0.05 ppm en cacao injerto, mismo que se encuentran dentro del marco legal de acuerdo al reglamento establecido por la Unión Europea (UE) en enero del 2019, misma que indica un límite máximo de 0.6ppm.

De acuerdo a los datos arrojados por el Software IBM SPSS 25, la investigación permite deducir que a un nivel de confianza del 95%, si existe diferencia significativa en los datos obtenidos de las concentraciones de Cadmio en almendras de cacao nacional e injerto proveniente de dos fincas aledañas al Rio Santa Rosa, mediante la técnica Voltamperométrica de SWV.

Palabras Claves: cacao, cadmio, voltamperometría, validación, precisión.

ABSTRACT

Cocoa cultivation is of great economic, social and environmental importance, establishing itself as a recognized raw material in international markets, for Ecuador it represents one of the most important activities after bananas, as it is essential as a raw material for the production of high quality chocolate, which is why producers and exporters have been concerned with controlling that Cocoa products do not contain degrees of toxicity, with respect to heavy metals such as cadmium that accumulates in almonds, posing a threat to consumer health, since excessive accumulation of this metal can lead to the formation of kidney stones, acute pneumonitis with pulmonary edema which contributes to the development of lung cancer.

Therefore, this study is based on the validation and development of a voltamperometric technique by Square Wave Voltametry (SWV) for the determination and quantification of cadmium in almonds of two cocoa varieties; and graft from two farms located in the Canton Santa Rosa, where metallurgical activities are carried out that generate residues of heavy metals such as cadmium, causing contamination of the water resource, the Santa Rosa river, which is used for irrigation of cocoa crops, causing pollution rates in their content.

For the analysis of cocoa almonds, a random sampling of the cocoa cobs was performed, then a quartet to take a representative sample and then moved to the laboratory for the respective drying on a stove at 75°C for one day, the dried samples are removed from the shell and with the help of a mortar the seeds are crushed, it proceeds with calcination in crucibles at 400°C for 8 hours, it was then transferred to a desiccator to cool down and undergo the acid digestion process, finally for voltametric analysis validation parameters were established such as: accuracy, accuracy, linearity, sensitivity, detection limits and quantification, obtaining satisfactory results, with a determination coefficient $R^2 \times 0.9987$. A Gold-tipped Teflon electrode was labeled in the electrolytic medium of Thiourea 0.01 mol L^{-1} + sulphuric acid $0.0035 \text{ mol L}^{-1}$ with a pH 2.4, applying parameters of: $f = 60\text{Hz}$; $\Delta E_p = 60\text{mV}$; $\Delta E_s = 50\text{mV}$, considered the most optimal for the SWV technique.

Consequently, cadmium concentration levels of 0.30 ppm were obtained in domestic cocoa and 0.27 ppm in graft cocoa at farm 1, while for farm 2 concentrations of 0.14 ppm were found in domestic cocoa and 0.05 ppm in graft cocoa, which are within the

legal framework in accordance with the regulation established by the European Union (EU) in January 2019 , which indicates a maximum limit of 0.6ppm.

According to data from IBM SPSS 25 Software, the research infers that at a 95% confidence level, if there is a significant difference in data obtained from Cadmium concentrations in domestic cocoa and graft almonds from two farms surrounding the Santa Rosa River, using SWV's Voltamperometric technique.

Keywords: cocoa, cadmium, voltamperometric, validation, precision.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
JUSTIFICACIÓN	4
OBJETIVOS.....	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
HIPÓTESIS	6
Hipótesis general	6
Hipótesis Específica.....	6
VARIABLES	6
Variable Dependiente.....	6
Variable Independiente.....	6
CAPITULO I.....	7
1. MARCO TEÓRICO.....	7
1.1 Cacao.....	7
1.1.1 Almendra de Cacao	8
1.1.2 Composición química del Cacao.....	9
1.1.3 Cacao en el Ecuador	9
1.1.4 Cacao Nacional	10
1.1.5 Cacao Injerto	11
1.2 Metales Pesados	12
1.2.1 Cadmio	12
1.2.2 Absorción de Cadmio en cultivos de Cacao.....	13
1.2.3 Mecanismo de absorción	13
1.2.4 Cinética de absorción	15
1.2.5 Trazabilidad del cadmio en cacao	15
1.2.6 Especiación del cadmio.....	16
1.2.7 Metabolismo del Cadmio	17
1.2.8 Riesgos a la salud por contaminación de cadmio	17
1.2.9 Límites aceptables de Cadmio en Cacao	18
1.3 Métodos para cuantificar metales pesados	18
1.3.1 Digestión Ácida.....	19
1.3.2 Métodos Electro analíticos	19

1.3.3	Potenciometría	20
1.3.4	Cronoanmperometría.....	21
1.3.5	Cronocoulometría.....	22
1.3.6	Voltamperometría	23
1.3.8	Validación	26
CAPÍTULO II		30
2.	METODOLOGÍA	30
2.1	Materiales y métodos.....	30
2.1.1	Materiales.....	30
2.1.2	Reactivos	31
2.1.3	Equipos.....	31
2.2	Ubicación de la investigación	32
2.3	Ubicación del área de estudio	32
2.3.1	Población y muestra	33
2.4	Desarrollo Experimental.....	33
2.4.1	Preparación de la muestra para el proceso.....	33
2.4.2	Preparación de soluciones.....	33
2.4.3	Preparación de solución buffer de Tiourea (CH ₄ N ₂ S) 0.01 M y Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄)0.0035 M.....	34
2.4.4	Preparación de solución patrón de cadmio.....	35
2.4.5	Preparación de muestras sintéticas de Cadmio	35
2.4.6	Preparación de muestras de almendras de Cacao.....	35
CAPÍTULO III.....		38
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
3.1	Parámetros óptimos para Voltametría de Onda Cuadrada	38
3.1.1	Efecto del pH en la solución Buffer	38
3.1.2	Efecto de la frecuencia (f).....	39
3.1.3	Efecto del pulso de amplitud (ΔE_p).....	40
3.1.4	Efecto del tamaño de paso (ΔE_s).....	41
	41
3.1.5	Efecto de la concentración de Cadmio para Validación de Método Voltamperometrico por SWV.....	42
3.1.6	Determinación de Cadmio en Almendras de Cacao.....	45
3.1.7	Análisis estadísticos	50
CAPITULO IV		53
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53

4.1	Conclusiones	53
4.2	Recomendaciones.....	54
	BIBLIOGRAFÍA.....	55
	ANEXOS.....	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ilustración del Cacao.	7
Figura 2: Cacao Nacional.....	11
Figura 3: Cacao Injerto.....	11
Figura 4: Mecanismo de ingreso del Cd a las plantas a través de la raíz hasta llegar al xilema ⁹	14
Figura 5: Onda utilizada en Cronoanmprometría de doble paso Potencial.	22
Figura 6: Onda utilizada en Cronocoulometría de doble paso potencial.	22
Figura 7: Técnica de voltametría Diferencial de Impulsos y voltagrama.	24
Figura 8: Técnica de Voltametría de Onda Cuadrada y voltagrama.	24
Figura 9: Celda electroquímica para voltametría.....	25
Figura 10: Ubicación de la investigación.....	32
Figura 11: Ubicación de fincas en Cantón Santa Rosa.	32
Figura 12: Voltagrama de SWV comparando pH (4.2, 2.4 y 1.8), en una solución de Tiourea 0.01 mol L-1 + ácido sulfúrico 0.0035 mol L-1 en presencia de 1 mg/Kg de Cd. Condiciones de la SWV: f= 60Hz; $\Delta E_p= 60\text{mV}$; $\Delta E_s=50\text{mV}$	38
Figura 13: Voltagrama de SWV comparando f (20, 40 y 60 Hz), en una solución de Tiourea 0.01 mol L-1 + ácido sulfúrico 0.0035 mol L-1 en presencia de 1 mg/L de Cd. Condiciones de la SWV; $\Delta E_p= 60\text{mV}$; $\Delta E_s=50\text{Mv}$ y f= 60, 40 y 20Hz.....	39
Figura 14: Voltagrama de SWV comparando ΔE_p : 20, 40 y 60 Hz, en una solución de Tiourea 0.01 mol L-1 + ácido sulfúrico 0.0035 mol L-1 en presencia de 1 mg/L de Cd. Condiciones de la SWV; $\Delta E_s=50\text{Mv}$ y f= 60Hz y $\Delta E_p= 20, 40$ y 60mV.....	40
Figura 15: Voltagrama de SWV comparando ΔE_s : 10, 20, 40 y 50 mV, en una solución de Tiourea 0.01 mol L-1 + ácido sulfúrico 0.0035 mol L-1 en presencia de 1 mg/Kg de Cd. Condiciones de la SWV; f= 60Hz y $\Delta E_p= 20, 40, 60\text{mV}$ y $\Delta E_s=10, 20, 40$ y 50mV.	41
Figura 16: Voltagrama de SWV a diferentes concentraciones de Cd en una solución de Tiourea 0.01 mol L-1 + ácido sulfúrico 0.0035 mol L-1. Parámetros: f= 60Hz; $\Delta E_p= 60\text{mV}$; $\Delta E_s=50\text{mV}$, considerados los más óptimos, a concentraciones de 0.01, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/L (ppm).....	42
Figura 17: Curva de Calibración de muestras sintéticas para detección de Cadmio mediante SWV.....	43

Figura 18: Voltograma de SWV en muestras digeridas de almendras de Cacao, con una solución de Tiourea 0.01 mol L ⁻¹ + ácido sulfúrico 0.0035 mol L ⁻¹ . Parámetros: f= 60Hz; ΔE _p = 60mV; ΔE _s =50mV, considerados los más óptimos, a concentraciones de 0.01, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/L (ppm).....	46
Figura 19: Dispersión de las concentraciones de Cadmio mediante diagrama de Caja y bigote.	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características fisicoquímicas del Cacao.....	8
Tabla 2: Constituyentes por cada 100g de cacao en base seca,.....	9
Tabla 3: Modelos Cinéticos de Adsorción.....	15
Tabla 4: Límites aceptables de cadmio por normas Reguladoras.	18
Tabla 5: Diluciones de Cadmio para determinación por SWV.	35
Tabla 6: Repeticiones de intensidad de corriente de concentraciones de Cd variadas para construcción de la Curva de Calibrado.....	43
Tabla 7: Resultados de Precisión del Método SWV	44
Tabla 8: Resultados de Exactitud del Método SWV	44
Tabla 9: Resultados de Limite de Cuantificación y Detección	45
Tabla 10: Muestras de almendras de Cacao Nacional e Injerto.	45
Tabla 11: Concentración de Cadmio en almendras de Cacao Nacional procedentes de la Finca 1.	47
Tabla 12: Concentración de Cadmio en almendras de Cacao Injerto procedentes de la Finca 1.	47
Tabla 13: Concentración de Cadmio en almendras de Cacao Nacional procedentes de la Finca 2.	47
Tabla 14: Concentración de Cadmio en almendras de Cacao Injerto procedentes de la Finca 2.	47
Tabla 15: Concentración de Cd en almendras de Cacao Nacional e Injerto.	48
Tabla 16: Comparación de Concentraciones de Cadmio con Límites permisibles por las diferentes Normas Reguladoras.....	49

INDICE DE ANÉXOS

Anexo 1: Río Santa Rosa de la Provincia de EL Oro y presencia de contaminación minera.	60
Anexo 2: Recolección aleatoria de mazorca de cacao	60
Anexo 3: Cacao nacional e injerto.	60
Anexo 4: Secado y descascarado de la almendra de cacao.	61
Anexo 5: Triturado y etiquetado de muestras representativas de cacao.	61
Anexo 6: Calcinación de muestras de cacao.	61
Anexo 7: Digestión ácida de cenizas de cacao.....	62
Anexo 8: Potenciostato/Galvanostato constituido por: electrodo de trabajo de oro, alambre de platino como contraelectrodo y electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia.	62

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial América Latina representa el 80% de la producción de Cacao, donde el Ecuador se destaca por aportar con el 54% del valor total ¹, su almendra es utilizada para la fabricación de chocolate de alta calidad, razón por la cual tiene una gran importancia económica para el país. Este producto se caracteriza por tener un aroma agradable, ser fuente rica en minerales como zinc, magnesio, hierro, entre otros, además de poseer hidratos de carbono y grasa vegetal que brindan energía potencial al ser humano².

En la provincia del El Oro el cantón Santa Rosa mantiene como base económica actividades como la agricultura, ganadería y producción de camarón, destinando terreno al cultivo de cacao, banano, yuca, café entre otros, además la crianza de animales de corral y ganado bovino y porcino. Sin embargo, existe una actividad significativa que gana espacio y genera mayores ingresos para el mencionado cantón; la minería considerada como una de las actividades más primitivas de la humanidad, utilizada para la elaboración de utensilios³. Esta actividad proveniente del sector primario lleva a cabo el proceso de explotación y extracción de minerales preciosos y por consecuencia genera residuos (metales pesados), el manejo inadecuado de los metales pesados como resultado del proceso de extracción de minerales representa un problema para los recursos naturales sobre todo el hídrico.

La contaminación por metales pesados en ríos y quebradas afecta directamente al suelo y por ende a los cultivos entre ellos uno de relevancia económica y productiva; el cultivo de Cacao, por medio de las almendras se absorbe metales pesados como cadmio constituyendo un riesgo para la salud del ser humano. La mayor exposición de metales pesados es mediante la ingesta de alimentos contaminados y agua, por consiguiente, al ser expuestos de manera crónica causa enfermedades cardiovasculares, trastornos respiratorios - nerviosos, cálculos renales, entre otros.

Es fundamental mantener un control de los niveles de cadmio en almendras de cacao previniendo que excedan los límites establecidos por la Normativa Alimentaria de la Comunidad Europea, donde indica como límite máximo 0.6 ppm para cadmio, (vigencia 1 de enero 2019)⁴. Por otro lado, el Codex alimentarius

indica límite máximo para cadmio es de 0.1 ppm⁵, el incumplimiento de las normas reglamentarias representan riesgo para el sector exportador de Cacao.

La determinación de cadmio se realiza mediante espectrometría de adsorción atómica y por técnicas voltamperométricas, como la Voltametría de onda cuadrada, la cual se basa en la respuesta corriente – potencial, es decir que una vez que se den las medidas de intensidad de corriente se recibe información de la especie química de interés. Es esencial que la técnica a desarrollarse tenga altos niveles de sensibilidad para que genere resultados adecuados y precisos, por lo tanto, este estudio se basa en el desarrollo y validación de una técnica electro analítica, eficaz, sencilla y de bajo costo, como es la SWV para determinar y cuantificar la concentración de cadmio en almendras de cacao nacional e injerto provenientes de dos fincas ubicadas en el cantón Santa Rosa, donde se realizan actividades metalúrgicas, que generan residuos que no reciben el tratamiento pertinente. Para así demostrar un método más exacto que suministre aportes característicos del fruto que permitan un mejoramiento en el control de la producción de cacao.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Cacao es considerado un cultivo relevante para el sector comercial, por tal razón numerosos productores y exportadores realizan controles de calidad periódicos para determinar la concentración de agentes contaminantes como cadmio específicamente. En los últimos años el cadmio ha causado controversia, el uso excesivo, la falta de gestión a los residuos que lo contiene (mineros) y el desecho de estos directamente al ecosistema evidencian impactos ambientales y sociales.

La contaminación del recurso hídrico por este metal afecta directamente a los cultivos de cacao originando índices de contaminación en su contenido, razón por la cual se han actualizado las regulaciones en la Normativa de la Comunidad Europea estableciendo nuevos valores que limitan la presencia de estos⁶.

La problemática se centra en la presencia de Cadmio en almendras de cacao nacional e injerto en la parroquia la avanzada del Cantón Santa Rosa, sitio donde se realizan actividades metalúrgicas, mismas que generan residuos que no reciben el tratamiento pertinente, siendo la disposición final el río Santa Rosa el más aledaño a fincas destinadas al cultivo de cacao, donde filtran al subsuelo contaminándolo, provocando que los metales pesados sean absorbidos por los cultivos, concentrándose en almendras de cacao y que a su vez al ser consumidas por el ser humano representa una amenaza para la salud y un riesgo para la industria cacaotera.

JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador no se han realizado investigaciones que evalúen cuantitativamente el contenido de cadmio en Cacao mediante la técnica de Voltametría de Onda Cuadrada; lo cual otorga relevancia a la investigación que tiene como objetivo cuantificar el contenido de cadmio presente en este alimento. La toxicidad de este metal, representa un riesgo potencial a la salud humana y al entorno, por lo cual es esencial realizar estudios que generen datos concretos sobre las concentraciones de cadmio, obteniéndose resultados que pueden influir en el sector productivo del País.

El Cacao es considerado uno de los cultivos de mayor demanda en Ecuador, por su gran importancia económica, representando un cultivo esencial por lo cual se requiere el desarrollo de métodos más exactos que suministren aportes característicos del fruto que permitan un mejoramiento en el control de la producción de cacao.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar la técnica de Voltametría de Onda Cuadrada para la determinación de cadmio en almendras de cacao nacional e injerto en el cantón Santa Rosa.

Objetivos específicos

Recolectar muestras de almendras de cacao en dos puntos estratégicos del cantón Santa Rosa.

Desarrollar y validar la técnica de Voltametría de Onda Cuadrada para cuantificar cadmio.

Determinar mediante Voltametría de Onda Cuadrada la concentración de cadmio en las muestras de almendras de cacao digeridas.

HIPÓTESIS

Hipótesis general

Es posible la presencia de cadmio en almendras de cacao debido a que los cultivos de este fruto son regados con agua de río, donde son descargadas aguas residuales minero-metalúrgicas.

Hipótesis Específica

La técnica, Voltametría de Onda Cuadrada es una alternativa exacta y precisa para la cuantificación de cadmio en almendradas de cacao.

VARIABLES

Variable Dependiente

Concentración en ppm de cadmio presente en muestras de almendras de cacao.

Variable Independiente

- Las dos especies de cacao; nacional e injerto a analizar son esenciales para llevar a cabo la cuantificación de cadmio.
- Lugar de toma de muestra de las almendras de cacao.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Cacao

El cacao es un fruto procedente de los bosques tropicales de América del sur, pertenece a la familia de las Malvaceae, su nombre científico es *Theobroma Cacao* L., la estructura y tamaño de los frutos con frecuencia son de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro, sus colores varían entre amarillo, rojo y café, en su interior tienen alrededor de 20 a 30 almendras⁷, como se indica en la Figura 1.



Figura 1: Ilustración del Cacao.

Fuente: Elaboración propia

Este cultivo tiene gran importancia económica, social y ambiental, estableciéndose como una materia prima reconocida en mercados internacionales, para el Ecuador representa una de las actividades de mayor relevancia después del banano, ya que es esencial como materia prima para la producción de chocolate de alta calidad, con características únicas como aroma agradable y delicioso sabor. Además de los beneficios que brinda al organismo, ya que contiene importantes minerales e hidratos de carbono y grasas vegetales⁸.

Características fisicoquímicas del Cacao

Son diversos los factores que pueden influir en la composición fisicoquímica de las almendras de cacao como son: germinación, tipo de cacao, maduración, secado y que tan adecuada sea su fermentación. A continuación, en la Tabla 1 se puede examinar las características propias del cacao⁹.

Tabla 1: Características fisicoquímicas del Cacao ⁹.

Variables	Grano (%)
pH	5,91
Grasa	48,58
Cenizas totales	3,27
Sólidos totales	42,92
Fibra cruda	4,3
Proteína	12,25
Humedad	8,5

1.1.1 Almendra de Cacao

La calidad del cacao reside en el tratamiento que recibe su almendra. Lo cual parte desde la recolección de frutos sanos, se extraen almendras para ser dispuestas en recipientes especiales y bajo condiciones apropiadas sean sometidas a diversas transformaciones fisicoquímicas. Una característica predominante para obtener un producto con sabor original a chocolate radica en los procesos de fermentación y secado del Cacao¹⁰.

La almendra de cacao requiere una preparación previa antes de su industrialización, razón por la cual se llevan a cabo diversas etapas de operación que parten con la cosecha de la mazorca, cuando alcanzan la maduración óptima con el propósito de obtener las almendras, posteriormente pasan al proceso de fermentación y como último punto el secado¹¹.

A continuación, se describen las fases del proceso de beneficio del Cacao:

Quiembra y desgrane: esta etapa se ejecuta hasta 5 días posteriores a la cosecha, consiste en realizar cortes longitudinales cuidando de no tocar las almendras que se encuentran pegadas a la placenta de la mazorca. Se procede a extraer las almendras separadas de la placenta para ser sometidas al proceso de fermentación, es importante revisar minuciosamente para evitar que se filtren cascaras o partículas extrañas y almendras en mal estado¹².

Fermentación: la duración depende del número de pigmentos purpura en almendras frescas y mientras más potente la fermentación debe ser más prolongada, de 6 a 7 días. Durante esta etapa por acción de microorganismos se produce ácido acético que penetran en los cotiledones disminuyendo el pH de 6.4 A 4.5, también se forman azúcares reductores, reacciones enzimáticas permitiendo la formación de aminoácidos libres y partiendo de proteínas péptidos, hidrólisis de antocianinas y oxidación de polifenoles, causantes de proporcionar aroma y sabor característico¹¹.

Secado: el objetivo de esta etapa consiste en alcanzar un aproximado de 55% de humedad y 7% de acidez en almendras fermentadas. El periodo de secado va de 5 a 7 días para que los cambios químicos que se produzcan proporcionen el sabor y aroma conveniente, caso contrario de que el secado no se complete o se dé rápido se corren riesgos de inactivación de las enzimas, provocando que la almendra sufra deformaciones y se endurezca afectando su calidad¹³.

Almacenamiento: los granos secos deben ser dispuestos en sitios que brinden condiciones óptimas para evitar su contaminación, como lugares techados, ventilados con claridad. Es conveniente realizar un control y monitoreo constante de la humedad durante el almacenamiento⁷.

1.1.2 Composición química del Cacao

La composición química permite determinar los componentes que se encuentran en el Cacao, proporcionando información sobre sus contenidos. En la presente Tabla 2 se observa la composición química que tiene el cacao por cada 100g del mismo⁷.

Tabla 2: Constituyentes por cada 100g de cacao en base seca⁷,

Bioelemento	Contenido	Unidades	Bioelemento	Contenido	Unidades
Calorías	456	Cal	Fósforo	537	mg
Agua	3,6	MI	Calcio	106	mg
Proteína	12	G	Tiamina	0,17 - 0,24	mg
Grasa	46,3	G	Riboflamina	0,14 - 0,41	mg
H. carbono	34,7	G	Niacina	1,7	mg
Fibra	8,6	G	Á. Ascórbico	3	mg
Glucosa	ago-13	G	Piridina	0,9	mg
Sucrosa	0,4 - 0,9	G	Hierro	3,6	mg

Debido al elevado valor calórico que poseen los productos derivados del cacao, como el chocolate, han sido catalogados como poco saludables para la alimentación del ser humano, sin embargo de acuerdo a las nuevas tendencias y variedades que se han insertado en el mercado de alimentos, estos productos tienen una gran acogida por el consumidor ya que presenta diversos beneficios para salud por su valioso contenido de polifenoles, que permiten modelar sucesos oxidativos ligados con la presencia de trastornos cerebro y cardiovasculares¹⁴.

1.1.3 Cacao en el Ecuador

El aroma del Cacao ecuatoriano tiene gran distinción debido al contenido de ácido linoléico, su aroma floral es único razón por la cual es considerado como la materia

prima irremplazable en la industria del chocolate. Su imponente sabor lo hace destacar en comparación con cualquier otra mezcla de chocolate¹⁵.

En la actualidad la demanda de Cacao apunta a productos orgánicos que no contengan grados de toxicidad, con respecto a metales pesados, que representan una amenaza para la salud del consumidor y por otra parte afecta a la economía del país, debido a que se reducirían las exportaciones de este producto⁸.

A nivel mundial América Latina representa el 80% de la producción de Cacao, donde el Ecuador se destaca por ser el cuarto país exportador y aportar con el 54% del valor total. Para el 2015 debido a la gran importancia que tiene este cultivo en el conjunto de productos exportados, los aportes aumentaron a 236 mil TM lo cual significo 91% del total de exportaciones de cacao ¹. Sin embargo, para el 2018 el Ecuador participa con un incremento del 63% de la producción de cacao fino de aroma, siendo sus principales destinos de exportación: La Unión Europea y Estados Unidos, teniendo un precio aproximado de \$2123 (\$/TON)¹⁶.

Existen dos variedades de cacao: Cacao Nacional Arriba (fino) y Cacao Injerto de la especie CCN 51 (corriente), se cultivan en las provincias Costeras debido a su clima tropical. Aproximadamente el 90% de la producción de cacao nacional se lleva a cabo mediante técnicas tradicionales y semitecnificadas, por otro lado, la variedad CCN 51 se realiza en sistemas tecnificados¹.

1.1.4 Cacao Nacional

El Cacao Nacional es un producto que crece únicamente en el Ecuador debido a su clima tropical, principalmente en provincias costeras como: el Guayas, los Ríos y el Oro, también se lo denomina como cacao fino o de aroma. Entre las características físicas de la mazorca se destaca la forma ovalada, cascara gruesa de color verde y a medida que madura se torna amarilla, en el interior contiene almendras que varían de tamaño con un color característico morado¹⁷.

Este Cacao fino o de aroma, como se muestra en la Figura 2, tiene mayor importancia a nivel mundial ya que es un fruto de mayor demanda en exportación por sus múltiples usos en la industria alimentaria debido a su delicioso sabor, tal es el caso en la fabricación de chocolate de alta calidad.



Figura 2: Cacao Nacional.
Fuente: Elaboración propia.

1.1.5 Cacao Injerto

En la Figura 3 se muestra el Cacao Injerto, el cual es un fruto consecuente de la injertación de dos partes genéticamente diferentes; la yema o injerto, que se obtiene de una planta seleccionada por su excelente producción, mayor rendimiento y calidad, la planta de cacao nacional y la otra es un patrón o porta injerto que es una planta procedente de semilla, el más utilizado es el gen CCN51. Es importante tener en consideración las condiciones óptimas para la injertación como son; temperatura, humedad, oxígeno, época de injertación, grosor de tallo, entre otras. La mayor ventaja de realizar este método es obtener frutos de alto rendimiento, fácil adaptación al medio y mayor tolerancia a plagas¹⁸.



Figura 3: Cacao Injerto.
Fuente: Elaboración propia.

1.2 Metales Pesados

Los metales pesados son constituyentes naturales de la corteza terrestre, se caracterizan por tener densidad superior a 5 g/cc, y poseer propiedades metálicas, no son degradables y se consideran tóxicos¹⁹. La ingesta en bajas dosis de algunos metales pesados como cobre, zinc y manganeso son importantes para el adecuado funcionamiento del cuerpo y para los procesos bioquímicos y fisiológicos de las plantas, sin embargo la acumulación excesiva de estos metales desencadenan una serie de riesgos a la salud humana como envenenamientos, trastornos inmunológicos, discapacidades, deterioro del comportamiento psicosocial, entre otras²⁰.

Por otro lado, los metales pesados como cadmio y plomo son considerados como peligrosos, y no sustanciales para las funciones metabólicas y biológicas²¹, sin embargo actualmente la contaminación de los cultivos por estos metales ha aumentado debido a las actividades metalúrgicas que se desarrollan y por consecuencia frutos como el cacao al ser ingeridos a través de sus derivados como el chocolate se ven amenazados ya que en cantidades excesivas a los límites establecidos estos metales implican un riesgo tóxico a la salud, por tal razón los productores de cacao se ven en la necesidad de conocer los límites permisibles con el fin de evitar que las exportaciones se vean afectadas y por consecuencia la calidad del chocolate²⁰.

1.2.1 Cadmio

El cadmio es un elemento químico, cuya simbología es Cd, es de color blanco azulado de apariencia brillante, maleable, con una densidad de 8.642 g/cc, número atómico 48 y pertenece al grupo 12 de la tabla periódica, es un metal pesado, resistente a la corrosión, además de ser uno de los más tóxicos, no posee ninguna función biológica beneficiosa. Este metal no se encuentra puro en la naturaleza, solo mediante aleaciones con otros metales como el cobre, zinc y plomo. Por lo cual la procedencia del cadmio se da mediante actividad volcánica, lixiviación de rocas y en el agua del océano, en las últimas décadas este elemento se ha liberado al medio ambiente a partir de fuentes artificiales tales como: baterías de níquel-cadmio, combustión de carbón, metalizado, desperdicios humanos, fertilizantes de fosforo, y el que está causando mayor impacto la extracción y fundición de minerales²².

El cadmio es considerado como un principal contaminante ambiental e industrial ya que concentra las principales características que lo establecen como un tóxico peligroso, las cuales son:

- Bioacumulación
- Perpetuación en el ambiente
- Efectos adversos que atentan contra la vida del ser humano y el ambiente
- Se desplaza fácilmente a través de efluentes líquidos y el aire²³.

1.2.2 Absorción de Cadmio en cultivos de Cacao.

La búsqueda de la supervivencia y el desarrollo humano ha llevado a la exploración y explotación continua de los recursos minerales en todo el mundo, sin embargo, a pesar de los beneficios de desarrollo derivados de procesos metalúrgicos como la extracción y fundición de minerales, se ha degradado el ambiente, mediante la contaminación por metales pesados, originando impactos adversos al agua, recursos, suelos y cultivos²⁴.

La actividad minera es una de las principales fuentes de contaminación ambiental, debido a las operaciones que desarrolla como molienda, beneficio, fundición y refinación de metales, del cual se generan disposiciones de residuos y aguas residuales de minas²⁵, que no son descargados con los tratamientos pertinentes al ambiente, estas descargas contienen elementos peligrosos como son cadmio y plomo, y a causa del transporte fluvial estos residuos metálicos se dirigen a los cultivos los cuales absorben dichos metales provocando efectos negativos a la salud de las personas a través de la cadena alimentaria²⁶.

El cadmio ha tenido gran relevancia en la última década en vista de la importancia de calidad y seguridad de alimentos y salud humana, puesto que en los cultivos el cadmio migra fácilmente del suelo a las plantas, es rápidamente absorbido y se acumula en las almendras, entrando así a la cadena alimentaria y amenazando seriamente a la salud humana¹⁹.

Por otro lado, investigaciones indican que las condiciones climáticas, las propiedades del suelo, el genotipo de la planta y el manejo agronómico influyen significativamente en el control de la absorción de metales pesados en los cultivos, como es el caso de la disminución de pH del suelo provoca un incremento en la absorción de metales pesados ya que por lo general en condiciones ácidas el suelo tiene una mejor biodisponibilidad²⁷.

1.2.3 Mecanismo de absorción

En las plantas el cadmio es considerado un metal no esencial, sin embargo, es absorbido a través de procesos específicos y no específicos, donde los responsables del ingreso de

cadmio a la célula son: la proteína IRT1, que se deriva de la familia de transportadores de Zinc y Hierro y el transportador específico de calcio LCT1, por otro lado se conoce otra familia de transportadores como es la Nramp, la cual se ubica en la membrana de la vacuola, por lo cual puede desempeñar un papel en la movilizada del cadmio y no es su entrada a la raíz. Después que el cadmio ingresa la célula este puede interactuar con ligandos de S como: filoquelatinas (PCs) o glutatión (GSH) y ácidos orgánicos (citratos). Por otro lado, existen otras proteínas encargadas de la quelación del Cd las cuales son fuente rica en cisteína como lo es la melotioneinas (Mts), por lo tanto, el completo cadmio-ligando puede dirigirse internamente a la vacuola u otras células²⁸.

Generalmente el Cadmio se acumula en la raíz de la planta, aislado en las vacuolas celulares y únicamente una pequeña proporción se transporta hacia la superficie de la planta (parte aérea), concentrándose en tallos, hojas fruto y semillas. Otro mecanismo de ingreso del Cadmio a la vacuola es a través de un cotransportador de $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ localizado en la membrana de la vacuola. Por otro lado, los transportadores de cationes CAX que intervienen en el transporte de calcio a la vacuola, también permiten el transporte de cadmio. Por lo tanto, cuando este metal ingresa a la raíz de la planta se traslada al xilema por medio del apoplasto o simplasto, permitiendo la generación de complejos²⁹.

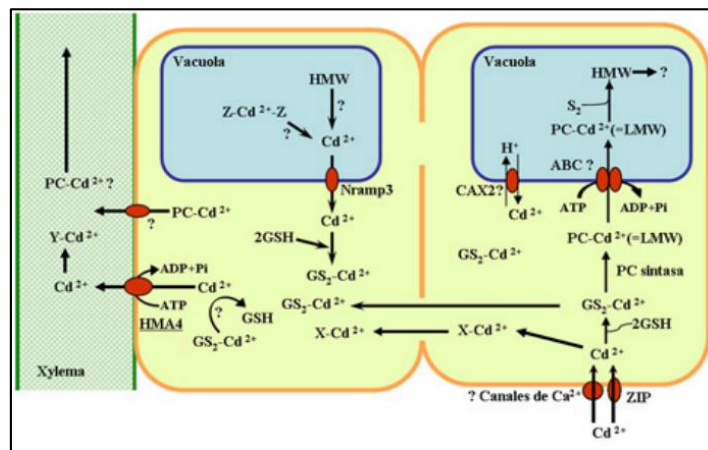


Figura 4: Mecanismo de ingreso del Cd a las plantas a través de la raíz hasta llegar al xilema²⁹.

En la Figura 4, se encuentra representado los mecanismos de ingreso del cadmio en raíces, en la derecha se encuentra una célula en contacto con la rizosfera y la izquierda en contacto con el xilema²⁹.

1.2.4 Cinética de absorción

Durante el proceso de adsorción se constituye una fase de equilibrio sobre un líquido entre un adsorbente y el adsorbato, la cual refleja un cociente de aproximación de equilibrio. El equilibrio de adsorción no se da repentinamente ya que el cociente de adsorción es escaso debido a los mecanismos de transporte y necesita en gran cantidad las propiedades tanto del adsorbente como del adsorbato³⁰.

A continuación, se muestran los modelos Cinéticos de Adsorción:

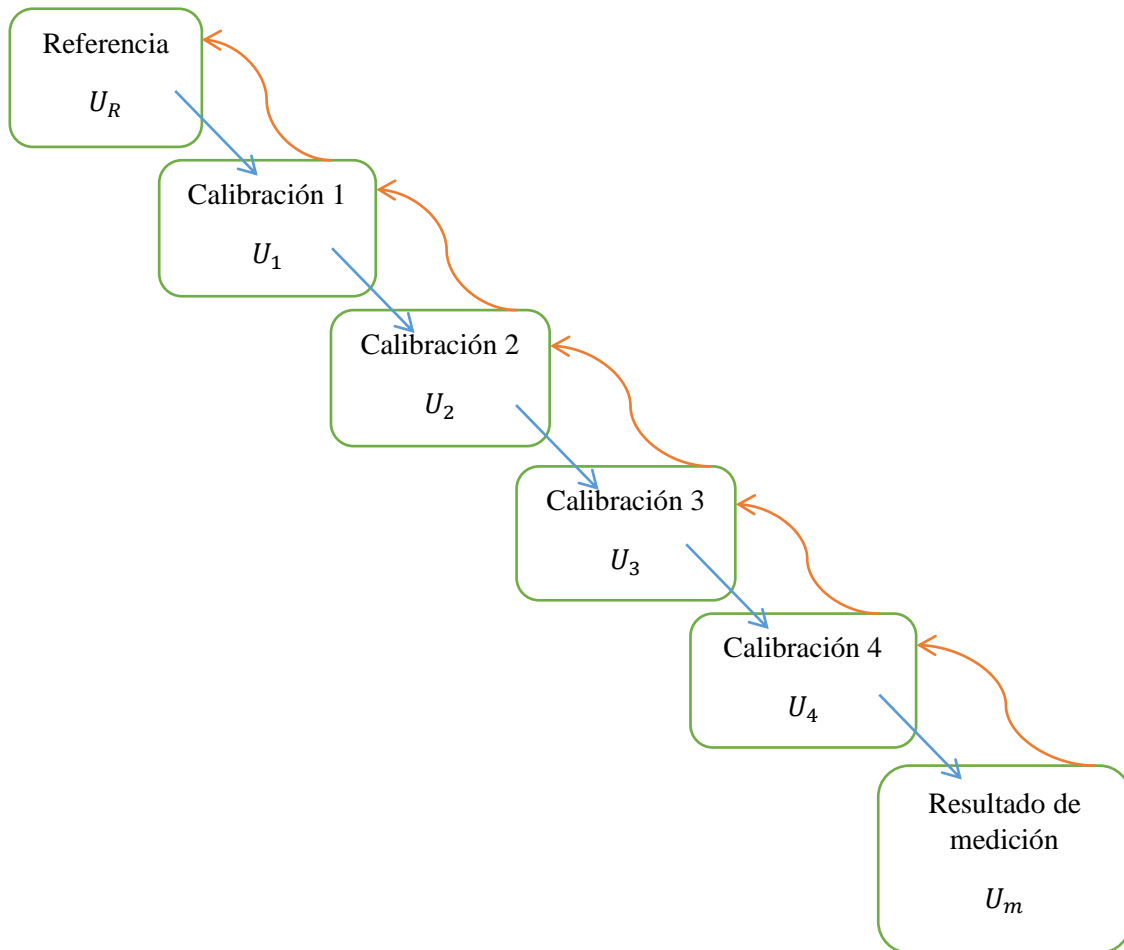
Tabla 3: Modelos Cinéticos de Adsorción

Modelo	Definición	Ecuación
Pseudo primer orden	Se fundamenta en la deducción de que a cada ión metálico le corresponde un punto de adsorción del adsorbente.	$\frac{dq_t}{dt} = k_1 * (q_e - q_t)$
Pseudo segundo orden	Se considera que el adsorbente concentra dos puntos activos de adsorbancia.	$\frac{dq_t}{dq} = k_2 * (q_e - q_t)^2$
Elovich	Es empleado en procesos de quimiadsorción, debido que son adsorbentes heterogéneos y producen energías de activación diferentes.	$\frac{dq_t}{dt} = \alpha * e^{-\beta * q_t}$
Difusión intrapartícula	Se basa en la vinculación de la adsorción específica y la raíz cuadrada del tiempo	$q_t = k * \sqrt{t}$

Fuente: Elaboración propia

1.2.5 Trazabilidad del cadmio en cacao

La trazabilidad en mediciones químicas tiene cualidades de resultados de medición y se relaciona con una referencia secuencial por una cadena continua y documentada de varias calibraciones las cuales provocan una incertidumbre de medición.



De acuerdo a la norma NTP ISO 17025 se establece que:

El laboratorio debe establecer y mantener la trazabilidad metrológica de los resultados de sus mediciones por medio de una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medición, vinculándolos con la referencia apropiada³¹.

1.2.6 Especiación del cadmio

La especiación química se refiere a la forma en que se encuentra distribuido un determinado elemento químico en las diversas especies que puede existir, en un medio definido, respecto a la biodisponibilidad de acuerdo a determinadas condiciones medioambientales³². Las especies de metales pueden encontrarse en estado ionizado o formando complejos, que pueden dar origen a diversos ligandos.

Los ríos son las principales fuentes de traslado de agentes químicos hacia el suelo, donde se generan muchas otras formas químicas y físicas donde algunas de ellas se encuentran biodisponibles o disponibles para ser absorbidas por organismos vivos. De

acuerdo a la biodisponibilidad de cadmio en el suelo se encuentran tres fraccionamientos químicos: total, cadmio intercambiable y cadmio en la solución del suelo. La fracción total está compuesta por cd intercambiable, en la solución y no intercambiable, es decir el cd que no se halla libre y muy escaso que pueda ingresar a la fracción intercambiable en largos periodos de tiempo. Por otro lado, la fracción intercambiable se basa en iones de Cd adsorbidos en las zonas reactivas de la materia viva, fracciones de arcilla y óxidos metálicos hidratados de bajo alcance, mismo que se encuentran disponibles para ser adsorbidos por las plantas. La fracción en la solución del suelo se encuentra formada por iones de cd libre o disueltos en la misma solución del suelo preparados para la adsorción. Diversos factores como pH del suelo, contenido de arcilla, materia orgánica, reactividad, contenido de macro-micro nutrientes catiónicos y conductividad eléctrica, influyen en el desplazamiento desde el intercambiable hasta la solución del suelo²⁸.

1.2.7 Metabolismo del Cadmio

El cadmio absorbido mediante la ingesta de alimentos, o por absorción en los pulmones ingresa al torrente sanguíneo en pequeñas concentraciones reteniéndose la mayor parte en la mucosa intestinal, ligada a la metalotioneína, ocurre una descamación de la pared permitiendo su eliminación. Por otro lado, la absorción de cadmio más concentrado ingresa a la mucosa para unirse a la circulación sanguínea³³.

1.2.8 Riesgos a la salud por contaminación de cadmio

En la actualidad los cultivos contaminados por cadmio y tomados por el hombre para incorporarlos a la cadena alimentaria, ha tomado gran importancia puesto que este metal cuando es ingerido a través de los alimentos expuestos con cadmio se almacenan en los riñones por un periodo aproximado de 18 a 30 años, es decir el organismo presenta mucha dificultad para eliminarlo, y a largo compromete a los órganos del cuerpo humano⁷.

El consumo de alimentos con alto contenido de cadmio podría producir disfunción tubular renal, formación de cálculos renales, alteración del metabolismo del calcio y esquelético, reproductivo y defectos respiratorios³⁴. La alta exposición al humo de óxido de cadmio produce neumonitis aguda con edema pulmonar lo cual puede ser letal, ya que contribuye al desarrollo de cáncer de pulmón. Por lo cual La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha catalogado al cadmio y compuestos de cadmio como cancerígenos para la salud humana³⁵. También puede ocasionar graves

riesgos en el embarazo, ya al ingresar al embrión a través de la placenta destruye la estructura morfológica de la misma lo que provoca efectos adversos como el parto prematuro o limitaciones en el crecimiento del feto³⁶.

1.2.9 Límites aceptables de Cadmio en Cacao

En la presente investigación dentro del marco legal se tomará en consideración los valores permisibles con respecto a la cantidad de cadmio que debe contener el cacao de acuerdo a las diferentes normas reguladoras como la OMG, Codex alimentario y la normativa comunitaria de la Unión Europea.

Tabla 4: Límites aceptables de cadmio por normas Reguladoras.

Instituciones Reguladoras	Reglamento (UE) Comisión Europea (CE)	Comisión de Códex Alimentario (CAC)	Organización Mundial de la Salud (OMS)
Concentraciones de Cadmio (ppm)	0,6	0,1	0,1

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 4 se identifican los niveles de cadmio permitidos para productos específicos de cacao por las diferentes normas reguladoras, con el objetivo de persuadir a los productores de cacao a tomar medidas de control y evitar inconvenientes en la exportación y comercialización del cacao en caso de que presenten concentraciones elevadas. Por tal razón, se toma en consideración el programa conjunto con la Organización de Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), al igual que la Comisión del Códex Alimentario, los cuales establecen niveles de cadmio de 0.1 ppm⁵.

Por otro lado, en el 2014 la Unión Europea, a través del Reglamento 488/2014 anuncia la implementación de nuevas regulaciones destinadas a productos específicos de cacao debido al elevado contenido de cadmio, misma que entró en vigencia el 1 de enero de 2019, indicando el nivel máximo aceptable de 0.6 ppm de cadmio⁴.

1.3 Métodos para cuantificar metales pesados

Los métodos regularmente utilizados para la determinación de metales pesados es la Espectrometría de absorción atómica, Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento – (ICP-MS) y Espectrometría de absorción de fluorescencia de rayos X, los análisis utilizando estas tecnologías sofisticadas implican mayores costos de reactivos y mantenimiento, mientras que las técnicas electroquímicas son más convenientes debido a que su operación es más sencilla, precisa y alcanza niveles de

sensibilidad superior a los métodos de espectroscopias ya mencionadas. Antes de aplicar cualquier método o técnica de cuantificación de metales es necesario identificar el estado de la muestra a analizar, ya que sea el caso de muestras en estado sólidas, van a requerir un tratamiento previo, mediante una digestión ácida asistida por microondas³⁷.

1.3.1 Digestión Ácida

Son varias las técnicas de digestión que se pueden utilizar para destruir la materia orgánica, entre ellos están: digestión ácida, digestión asistida por ultrasonido y digestión asistida por microondas, de los cuales esta última es considerada como la mejor técnica ya que al ser un sistema cerrado y climatizado en horno microondas presenta importantes ventajas como es la disminución de riesgos por contaminación y pérdida de analitos³⁸.

La Digestión Asistida por microondas utiliza la vibración de los enlaces de agua durante la radiación por microondas formando calor, de tal modo que se rompan los enlaces entre los metales y la materia orgánica, permitiendo la eliminación de la materia orgánica, para lo cual se requiere emplear una mezcla de reactivos como son ácido nítrico (HNO_3), ácido clorhídrico (HCl) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este proceso proporciona precisión en los resultados³⁹.

Por otro lado, la Digestión ácida, es una técnica más usual en la determinación de metales pesados, como cadmio, plomo, arsénico, utilizando ácidos concentrados para la liberación del metal de interés. Para dicho proceso de digestión los principales ácidos utilizados son: ácido nítrico (HNO_3), ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4)³⁹.

1.3.2 Métodos Electro analíticos

La electroquímica es una rama multidisciplinaria aplicable a diversos campos de la química, física y biológica⁴⁰. Esta ciencia tiene como propósito describir fenómenos que participan en la separación de carga, frecuentemente de soluciones, generalmente la separación de la carga se encuentra ligada a la transferencia de carga, misma que puede desarrollarse de manera homogénea en solución donde se localizan especies químicas distintas o por el contrario de manera heterogénea ubicada en el área superficial de los electrodos⁴¹. Es decir, la electroquímica alude a la reacción de una solución química que ocurre en la interfaz entre un conductor de electrones y un conductor iónico, dándose de

este modo un transporte de carga entre la solución química y el electrodo. Generalmente el electrodo es un metal o material semiconductor, mientras que el conductor iónico es llamado electrolito, el cual puede estar en solución o estado sólido⁴⁰.

Las técnicas electroquímicas son herramientas que se enfocan en analizar las propiedades eléctricas de una disolución y las reacciones redox que se desarrollan en una celda electroquímica, consintiendo la posibilidad de que se efectúe la transferencia de electrones entre componentes. Con frecuencia estas técnicas se las ha utilizado para el estudio de diversos minerales, para lo cual se diferencian algunas técnicas ampliamente desarrolladas, entre ellas destacan: Potenciometría, Cronoanmperometría, Galvanoplastia, Cronocoulombimetría, Voltamperometría, entre otras⁴².

1.3.3 Potenciometría

La Potenciometría es una técnica de lectura electrónica pertinente para aplicaciones de detección donde las cargas eléctricas acumulativas causan las diferencias en el potencial eléctrico en la parte superior de la capa dieléctrica. En la actualidad es una técnica muy utilizada, se fundamenta principalmente en la respuesta corriente vs potencial, permitiendo determinar la concentración de un soluto en solución. Para el desarrollo de esta técnica se utiliza un equipo llamado Potenciostato, un aparato que genera resultados confiables, este equipo consta de una celda electroquímica la cual tiene dos electrodos sumergidos en una solución que contiene al analíto, uno es un electrodo de referencia de potencial constante y otro es un electrodo indicador que corresponde al analíto estudiado y la composición de la muestra, el potencial entre dos electrones se mide utilizando un voltímetro de alta impedancia⁴³.

El electrodo de referencia tiene una contribución constante a la señal, independientemente de la matriz de la solución. Generalmente contiene un electrodo metálico en contacto con una sal insoluble del mismo metal y su potencial depende sólo de la solubilidad de la sal, el electrodo de referencia más utilizado es el cloruro de plata-plata (Ag/AgCl). Mientras que el segundo electrodo es el indicador el cual contiene una membrana sensible al compuesto a analizar, por lo que su potencial depende de la concentración del compuesto. El analíto de la solución de la muestra ingresa a la membrana del electrodo causando un cambio en el potencial de la membrana debido a la modificación de las propiedades electroquímicas. Por lo tanto se requiere utilizar un potenciómetro de alta impedancia para medir el potencial entre los dos electrodos⁴⁴.

1.3.3.1 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS)

EIS es la técnica más precisa y comúnmente utilizada para el diagnóstico de resistencia interna. El espectro de impedancia proporciona información útil para comprender las reacciones electroquímicas en el ánodo y el cátodo. EIS se ha utilizado popularmente para caracterizar las propiedades del material del ánodo y el cátodo y se emplea para investigar la biopelícula desarrollo y la cinética de las reacciones electroquímicas en un estudio realizado con *Geobacter sulfurreducens*. Midiendo la resistencia interna en términos de resistencia óhmica, la resistencia de transferencia de carga, y la resistencia de transferencia de difusión por separado solo es posible en EIS, por lo tanto, se prefiere sobre otros métodos como la interrupción de corriente y el método de pendiente. En esta técnica, las mediciones se llevaron a cabo utilizando un potenciostato en un rango de frecuencia de 100 kHz a 1 MHz con una señal de 10 mV de amplitud y las variaciones en la celda el voltaje y la corriente se registran usando un analizador de respuesta de frecuencia⁴⁵.

Las mediciones de EIS están representadas por un diagrama de Nyquist o un diagrama de Bode. En la gráfica de Nyquist, los valores negativos de la impedancia imaginaria (Z_{00}) se grafican contra la parte real de la impedancia (Z_0). Cada punto en el diagrama de Nyquist representa la impedancia a una frecuencia determinada. El principal inconveniente de las parcelas de Nyquist es que no proporciona información sobre qué frecuencia se utilizó para grabar un punto en particular. En el diagrama de Bode, la impedancia se traza con el logaritmo de frecuencia en el eje X y tanto el ángulo de fase como los valores absolutos de impedancia (jZ_j , ohm) graficado en el eje Y. La resistencia de la solución se obtiene a la frecuencia más alto punto. Los datos de baja y alta frecuencia se pueden obtener fácilmente del diagrama de Bode, y la diferencia entre ellos representa R_p . Se puede usar un elemento Warburg para formar un circuito equivalente al conectarse en paralelo con R_s o R_p para representar el mecanismo de difusión⁴⁵.

1.3.4 Cronoanmprometría

Es una técnica sensible y se ha aplicado a muchos estudios de forma independiente o en conjunto con otras técnicas electroquímicas. Esta técnica es dependiente del tiempo en la que se aplica un potencial de onda cuadrada al electrodo de trabajo, la corriente del electrodo es medida en función del tiempo y fluctúa según la difusión de un analito desde la solución a granel hacia la superficie del sensor⁴⁶. La técnica se realiza con un

electrodo estacionario en solución inactiva, inicialmente en circuito abierto en un potencial, donde el analito objetivo no sufre ninguna reacción electroquímica. Posteriormente, el potencial incrementa hasta un punto más allá del requerido para que el analito objetivo se oxide o reduzca electroquímicamente. Aquí su concentración superficial se convierte en cero, por lo tanto, la dependencia actual del tiempo actual se controla y se muestra a continuación⁴⁷. Figura 5.

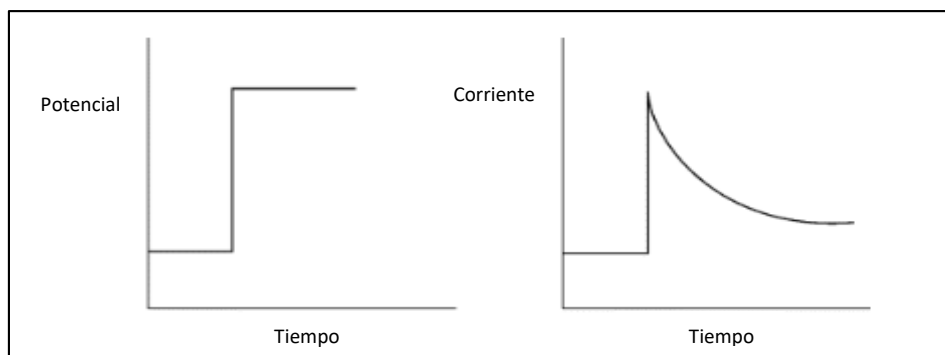


Figura 5: Onda utilizada en Cronoamperometría de doble paso Potencial⁴⁷.

1.3.5 Cronocoulometría

La Cronocoulometría es similar a la Cronoamperometría, excepto que la corriente está integrada y se estudia la variación de la carga con el tiempo. Las ventajas de la integración son que la señal aumenta con el tiempo, facilitando las mediciones hacia el final del transitorio, cuando la corriente es casi cero, la integración es efectiva para reducir el ruido de la señal y es relativamente fácil separar la carga capacitiva de la carga faradaica. Esta técnica es preferible a la Cronoamperometría para medir el área del electrodo y los coeficientes de difusión. Por otro lado, es el mejor método para llevar a cabo las mediciones de velocidades de reacción electroquímica después de una transferencia de electrones debido a las señales mejoradas que proporciona⁴⁸. Figura 6.

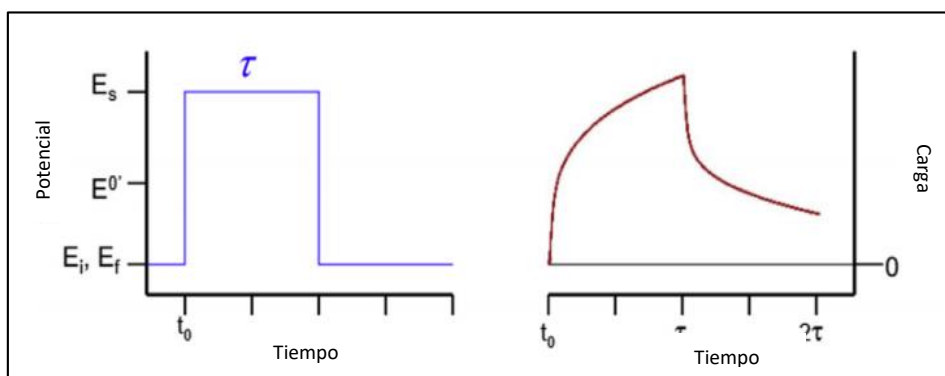


Figura 6: Onda utilizada en Cronocoulometría de doble paso potencial⁴⁸.

1.3.6 Voltamperometría

Esta técnica electroquímica permite aplicar un potencial variable a un electrodo de trabajo en un sistema electroquímico, y se mide la corriente correspondiente, el flujo de corriente eléctrica se logra realizar debido a la acción de reacciones de óxido-reducción que se llevan a cabo en la interfase electrodo-disolución, por lo tanto la reacción produce el transporte de electrones por medio del circuito externo, mismo que se encuentra conectado a un equipo que posee un voltímetro, destinado a medir la diferencia de potencial entre ambos electrodos, por lo tanto permite generar una corriente eléctrica que es captada por el equipo mediante un amperímetro ⁴⁵.

Existe una gran variedad de técnicas voltamperométricas que se pueden desarrollar, las cuales se diferencian principalmente debido a la variación del potencial aplicado, entre estas están: voltametría diferencial de impulsos, polarografía normal, voltametría de onda cuadrada, entre otras⁴⁹, sin embargo, esta última tiene mayor relevancia, ya que investigaciones realizadas han demostrado que es una técnica eficiente con alta sensibilidad y precisión para cuantificar metales pesados en unidades de ppm y ppb, el análisis voltamétrico es rápido con un tiempo de análisis de unos pocos segundos a un par de minutos⁵⁰.

1.3.6.1 Voltametría Diferencial de Impulsos (DPV)

La voltametría diferencial de impulsos utiliza un potencial inicial que es aplicado de gota en gota mediante reducidos incrementos de amplitud constante, durante el mayor lapso de vida de la gota. Es: previamente a la caída de gota se fija un impulso de potencial de valor constante por un breve tiempo. Por tanto, se procede en la misma gota a medir dos intensidades de corrientes, una denominada i_1 misma que se genera inmediatamente antes de aplicar el impulso y otra determinada como i_2 obtenida antes de la caída de la gota. La lectura se realiza como la diferencia entre las dos intensidades de corriente $i_2 - i_1$ de acuerdo al potencial, lo cual permitirá la formación de voltagramas de picos⁵¹. Figura 7.

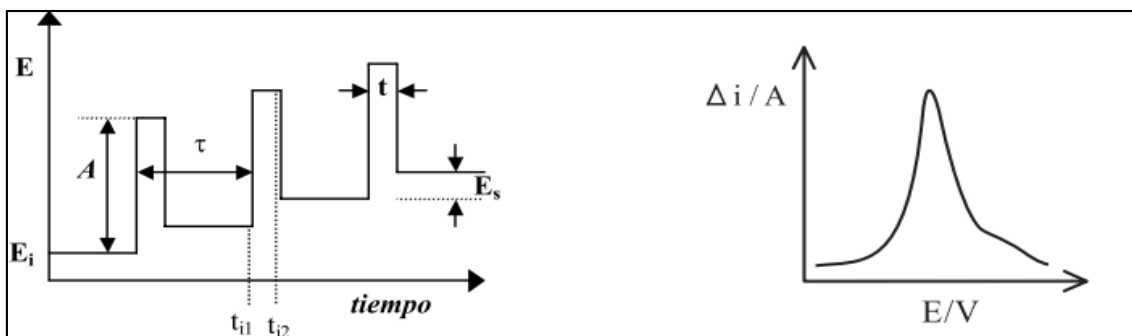


Figura 7: Técnica de voltametría Diferencial de Impulsos y voltagrama⁵¹.

1.3.6.2 Voltametría de Onda Cuadrada (SWV)

La técnica de voltametría de onda cuadrada se basa en mediciones de corriente por cortos periodos de tiempo, tomando como positiva una onda que apunta hacia arriba al tiempo t_{i1} y por el contrario toma otra onda como negativa hacia abajo al tiempo t_{i2} , lo cual permite establecer divergencias entre la intensidad de corriente indicándose $i_1 - i_2$ la cual se plantea en función del potencial en escalón, logrando producir un voltagrama de pico simétrico. Esta técnica se destaca de otras técnicas como la voltametría diferencial de impulsos (DPV) debido a su velocidad y alta sensibilidad (alrededor de 2 o 3 veces mayor a la DPV que se encuentra en un rango máximo de 10-8 mol/L), ya que la intensidad de corriente total da como resultado la adición de dos corrientes, una anódica (oxidación) y catódica (reducción), por lo tanto, genera voltagramas en periodos de tiempo muy reducidos⁵². Figura 8.

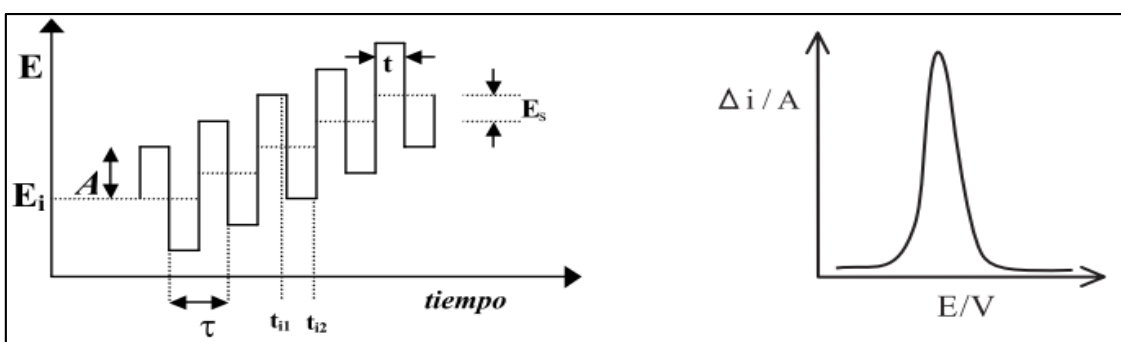


Figura 8: Técnica de Voltametría de Onda Cuadrada y voltagrama⁵².

1.3.7 Configuración de la celda electroquímica

La celda electroquímica se utiliza para generar voltaje y corriente a partir de reacciones químicas, mediante la entrada de señales electroquímicas, la energía eléctrica disponible es:

Energia electrica = volts x corriente x tiempo

Energia electrica = volts x coulombs

Energia electrica = EQ

Donde:

Q = nf , n es el n° de electrones involucrados en la reacción química

F = es la constante de Faraday = 96500 C (g equiv)

g equiv = n° de moles dividido por el n° de electrones involucrados en la reacción

E = es la fuerza electromotriz (fem) de la celda (voltios).

La celda electroquímica requiere de una limpieza adecuada para cada componente y comprobar una correcta conexión de los electrodos para establecer un montaje de manipulación sencilla. Para la configuración electroquímica es fundamental que la celda electroquímica esté constituida por un sistema de tres electrodos, que consiste en un electrodo de trabajo (WE), es donde se produce la reacción de interés, un electrodo de referencia (RE) y un auxiliar (AE), que se encuentran sumergidos en una solución electrolítica⁵³. Figura 9.

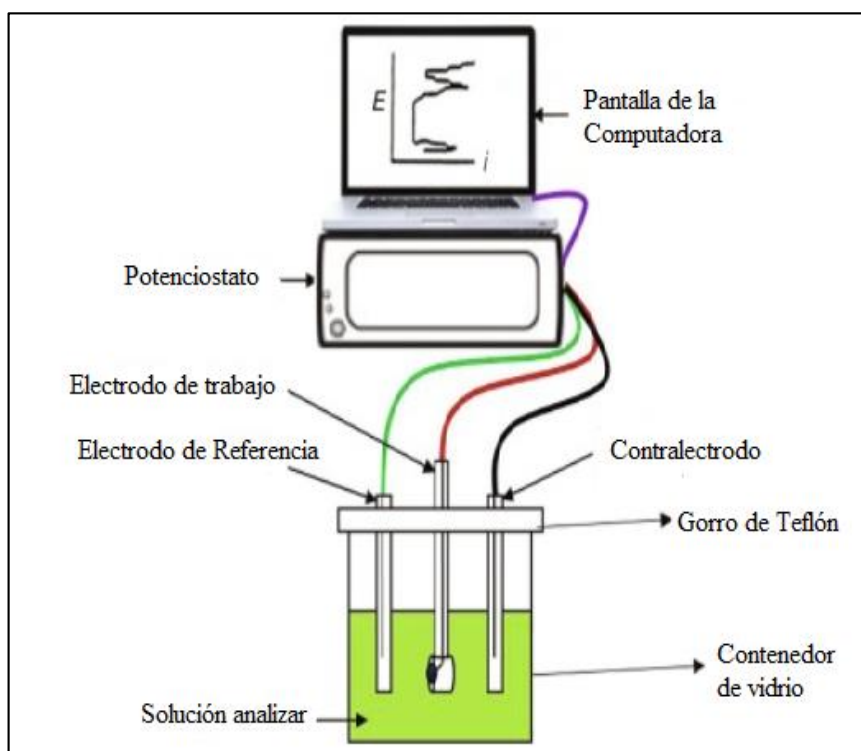


Figura 9: Celda electroquímica para voltametría⁵³.

1.3.7.1 Electrodo de Trabajo

El electrodo de trabajo hace contacto con el analito ya que su superficie es el lugar donde ocurre la reacción, luego de que este electrodo se aplica con cierto potencial, la transferencia de electrones entre el electrodo y el analito comienza a tener lugar. La corriente captada en el electrodo pasará a través del electrodo auxiliar (contra electrodo), para que haya un equilibrio. El electrodo de trabajo idealmente, debería tener una buena relación señal/ruido, respuesta reproducible sin reacciones de interferencia sobre el potencial de interés, alta estabilidad eléctrica, bajo costo, disponibilidad, baja toxicidad y estabilidad a largo plazo. Razones por la cual el electrodo de trabajo se ha fabricado con metales nobles como: Oro, Platino y Carbono en forma de grafito sintético⁵⁴.

1.3.7.2 Electrodo Auxiliar o Contraelectrodo

Los materiales conductores inertes como el platino y el grafito con áreas de superficie comparativamente grandes con frecuencia se utilizan como contra electrodo tanto para el ánodo como para el cátodo, el platino es resistente a la corrosión mientras que el carbono es de bajo costo y se puede desechar después de su uso⁵⁴.

1.3.7.3 Electrodo de Referencia

El electrodo de referencia tiene un potencial de reducción conocido, pero no pasa corriente por él, solo actúa como referencia al medir el potencial del electrodo de trabajo, los tres electrodos de referencia adoptados comúnmente son de: hidrógeno estándar (SHE), electrodo de calomel y el electrodo de plata/cloruro de plata. Este electrodo se coloca lo más cerca posible del electrodo de trabajo para minimizar cualquier caída causada por la resistencia celular, el electrodo de referencia ideal proporciona un potencial estable y conocido para que cualquier cambio que se de en la celda electroquímica se atribuya al efecto del analito sobre el potencial del electrodo indicador⁵⁵.

1.3.8 Validación

La validación es un método que se basa esencialmente en establecer si la aplicación de un método es viable o no, para lo cual se requiere realizar investigaciones y experimentaciones en laboratorios que permitan obtener resultados estadísticos que ayuden a fundamentar si el método voltamperométrico es conveniente para los fines previstos. Para determinar la validación de un método se deben considerar las

características analíticas típicas en la validación, entre ellas están: exactitud, precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación.

1.3.8.1 Linealidad

La linealidad es muy utilizada e indispensable en algunos métodos con el fin de realizar mediciones en diversas concentraciones. Frecuentemente la linealidad no puede ser cuantificada, pero puede ser verificada mediante pruebas de significancia de la no linealidad o pruebas rutinarias de inspección⁵⁷.

1.3.8.2 Sensibilidad

Describe la pendiente de la curva de respuesta o la concentración, establece que cuanto más empinada es la pendiente tendrá mayor sensibilidad y si la pendiente es levemente empinada su sensibilidad es baja⁵⁶.

1.3.8.3 Exactitud

La exactitud indica el valor que se encuentra más cerca del valor medio, estadísticamente la exactitud se relaciona con el sesgo de estimación, por lo tanto, la estimación es más exacta cuando el sesgo es menor⁵⁶. La exactitud se determina calculando el porcentaje de recuperación (%R) mediante la siguiente ecuación (Ec.1).

Ec.1

$$\%R = \frac{\text{Conc. calculada}}{\text{Conc. teórica}} \times 100$$

Donde, la concentración calculada es aquella que mide el equipo y la concentración teórica es la solución preparada. Para que la exactitud sea aceptable debe de tener un porcentaje de recuperación entre el 90% y el 120%.

1.3.8.4 Precisión

La precisión indica la dispersión de un grupo de valores que se obtienen de varias mediciones repetidas, dando a conocer, que cuando la dispersión es menor la precisión aumenta⁵⁶. Esta se calcula mediante el coeficiente de variación que debe ser menor del 1% en los análisis de repetitividad y menores al 2% en análisis de precisión siendo rangos aceptables, y el porcentaje del coeficiente de variación menor o igual al 2% considerado un valor aceptable, se calcula mediante la siguiente ecuación (Ec.2).

Ec.2

$$\%CV = \frac{S_b}{\bar{X}} \times 100\%$$

Donde, S_b es la desviación estándar¹ y \bar{X} es el promedio de las repeticiones de cada concentración del analito.

1.3.8.5 Límite de Detección (LD)

Se delimita que a una concentración dada se obtendrá un resultado de señal/ruido, considerándose la amplitud de la señal y el ruido que se produce en una línea de fondo, observándose que la concentración más pequeña se logra diferenciar notablemente a partir de cero⁵⁸. Definiéndose como la respuesta de señal según la concentración del analito con un factor de confianza (k) siendo mayor que la desviación estándar del blanco (S_b), determinándose con la siguiente ecuación (Ec.3).

Ec.3

$$LD = kS_b/m$$

Donde, k es igual a 3 siendo una constante establecida por la IUPAC, m es la pendiente de la curva de calibrado o sensibilidad y S_b es la desviación estándar del blanco.

1.3.8.6 Límite de Cuantificación (LC)

Se define como la medida más pequeña que contenga un analito y pueda ser analizada por un instrumento y cuantificada confiablemente, la cuantificación es el indicio para una concentración que es igual a diez veces la desviación estándar del blanco⁵⁸. En sí, el límite de cuantificación determina un aceptable nivel de incertidumbre con la menor concentración de analito que contenga una muestra, para determinar el límite de cuantificación tenemos la siguiente ecuación (Ec.4).

Ec.4

$$LD = kS_b/m$$

Donde, la constante k es igual a 10, m es la pendiente de la curva de calibrado o sensibilidad y S_b es la desviación estándar.

1.3.8.7 Curva de Calibración

La curva de calibración es el método más empleada en la validación, se obtienen mediante series de patrones, el método se basa en medir la propiedad analítica de interés en varias muestras, preparadas bajo las mismas condiciones y por lo tanto tienen una composición conocida. Una curva de calibración define la relación entre una señal analítica producida por el analito y su concentración, En el caso común de la calibración

lineal, se utilizará una regresión lineal para ajustar la señal analítica y a la concentración x del analito en las muestras de calibración⁵⁹.

Ec.5

$$Y = a + bx$$

Por otro lado, para la determinación de un desconocido, la ecuación de calibración se invierte:

Ec.6

$$x = -a + y/b$$

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

El tipo de investigación a desarrollar es descriptiva y experimental, ya que se llevó a cabo la descripción de actividades y procesos que se deben aplicar a las muestras de almendras de cacao nacional e injerto, por otro lado, se efectuará el análisis de los datos de variables compiladas en un determinado tiempo de acuerdo a las muestras, los cuales permitirán obtener resultados cuantitativos de las concentraciones de cadmio en ppm presentes en las muestras analizadas mediante la técnica Voltametría de Onda Cuadrada (SWV).

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Materiales

- Bata de laboratorio
- Mascarillas
- Guantes
- Gorros
- 5 Balones volumétricos de 25 ml
- Balón volumétrico de 50, 100 y 1000 ml
- Luna de reloj
- Crisoles
- Vasos de precipitación de 50, 100 y 250mL
- Pipeta volumétrica de 5 y 10 ml
- Micro pipetas de 2-20 y 10-1000u/L
- Pipeta graduada de 10 ml
- Matraz de 500 ml
- Agitador de vidrio
- Espátula
- Piseta
- Jeringa de 5ml
- Celda eletroquímica
- Electrodo de Oro (electrodo de trabajo)
- Electrodo de Ag/AgCl (electrodo de referencia)

- Electrodo de Alambre de Platino (contraelectrodo)

2.1.2 Reactivos

- Tiourea seca 0.01 ml L⁻¹ a partir de NH₂CSNH₂ 99.4% de pureza
- Ácido sulfúrico 0.0035 mol L⁻¹ a partir de H₂SO₄ 98% de pureza
- Ácido nítrico 0.1ml L⁻¹ a partir de HNO₃ 70% de pureza
- Ácido clorhídrico 0.2 y 6 ml L⁻¹ a partir de HCl 38% de pureza
- Hidróxido de sodio 0.1ml L⁻¹ a partir de NaOH 99% de pureza
- Cloruro de potasio saturado 3 ml L⁻¹ a partir de KCl
- Ferricianuro de Potasio 0.5 nM a partir de [Fe(CN)₆] 99% de pureza
- Solución estándar de cadmio y plomo a 1000 ppm
- Solución buffer de Tiourea + H₂SO₄ (pH 2.4)
- Agua des ionizada

2.1.3 Equipos

- Balanza Analítica RADWAG As.220.X2
- Medidor de pH/iones BOECO BT-6775
- Estufa MEMMERT VN6400
- Mufla 48000 BENCHTOP Muffe Furnace F48025
- Desecador
- Potenciostato/Galvanostato/FRA (SQUIDSTAT™ PLUS) equipado con el software Squidstat User Interface v2.09.28.2018 Beta
- Hot plate

2.2 Ubicación de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de investigaciones de Electroquímica y Bioenergía de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala, ubicada en la ciudad de Machala en la Av. Panamericana Km. 5 1/2 Vía a Pasaje. Figura 10.

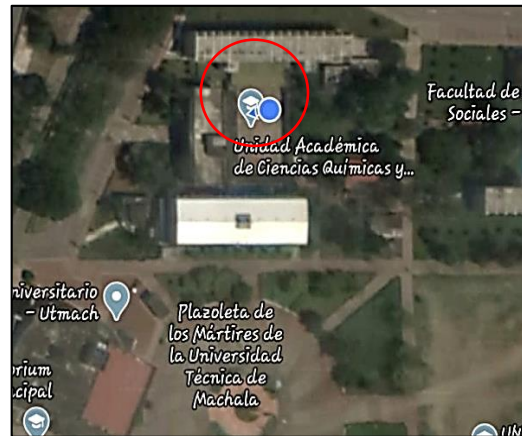


Figura 10: Ubicación de la investigación.
Fuente: Google maps

2.3 Ubicación del área de estudio

El presente estudio se realizó en dos fincas ubicada en la Zona de Aguas verdes de la parroquia la avanzada perteneciente al Cantón Santa Rosa - provincia de El Oro, fincas adyacentes al río Santa Rosa. Figura 11.

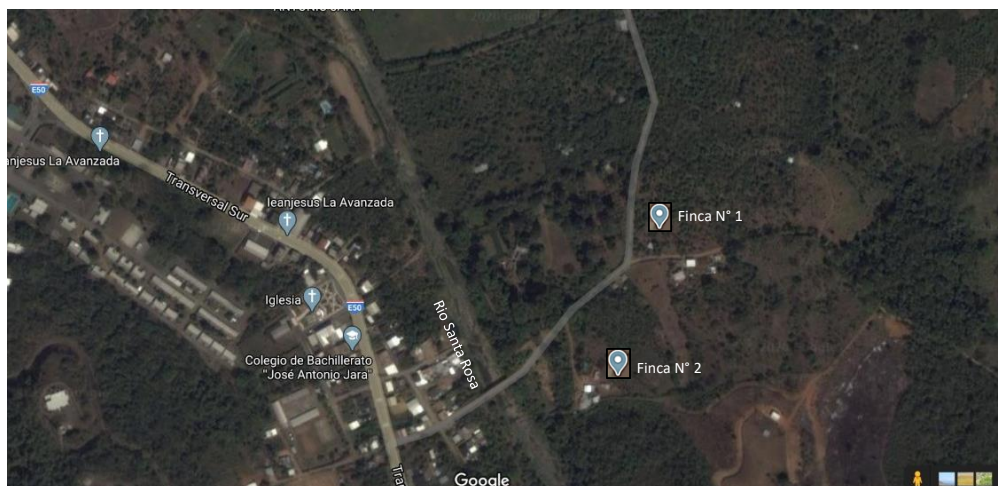


Figura 11: Ubicación de fincas en Cantón Santa Rosa.
Fuente: Google maps

2.3.1 Población y muestra

La población identificada son dos fincas productoras de Cacao ubicadas en la parroquia la avanzada del Cantón Santa Rosa, de las cuales se recolectó 15 muestras (mazorcas) de cada especie de cacao, nacional e injerto en cada finca.

2.4 Desarrollo Experimental

2.4.1 Preparación de la muestra para el proceso

1. Para la preparación de la muestra es necesario tomar 15 submuestras de manera aleatoria y posteriormente homogeneizar para aplicar método de cuarteo hasta obtener 1kg de muestra de cada finca.
2. De cada muestra se extraen las almendras separadas de la placenta y se colocan en fundas ziploc, rotuladas y transportadas al laboratorio, para someterlas al proceso de secado en el horno a 75°C durante 1 día.
3. Una vez que las muestras están secas se procede a quitar la cascarilla, se pesan 10 g, y con ayuda de un mortero se tritura las semillas durante 1 minuto, hasta que su tamaño de partícula sea de menor o igual a 5mm, procurando que no se forme una pasta.
4. Cada muestra de 10 g es colocada en crisoles previamente sometidos a 800°C durante 4 horas. Los crisoles con la muestra son sometidos a calcinación en una mufla a 400°C por 8 horas y luego trasladados a un desecador para que se enfríe y posterior pesado.

2.4.2 Preparación de soluciones

2.4.2.1 Preparación de Ácido Nítrico (HNO₃)

Para la preparación de ácido nítrico a 0.2M, se toma 11.92 ml de (HNO₃) para diluir y aforar con agua des ionizada en un balón volumétrico de 1000 ml, posteriormente se homogeniza.

2.4.2.2 Preparación de Ferricianuro de Potasio [Fe(CN)₆]

Para la preparación de Ferricianuro de potasio 0.5nM, se pesa 0.1 g de [Fe(CN)₆] para diluir y aforar con aguas des ionizada en un balón volumétrico de 100 ml, posteriormente se homogeniza.

2.4.2.3 Verificación de Instrumentación

2.4.2.3.1 Celda electroquímica:

Se utilizó una celda de vidrio de 25 ml de capacidad, la cual debe ser tratada con ácido nítrico 0.2 M, posteriormente se enjuaga con agua des ionizada después de cada análisis para eliminar impurezas de mediciones anteriores.

2.4.2.3.2 Electrodo Referencia (Ag/AgCl):

Se utilizó un electrodo de plata sumergido en solución saturada y encapsulada de cloruro de potasio, la cual se cambia periódicamente.

2.4.2.3.3 Electrodo auxiliar o Contra electrodo:

Como contra electrodo se utilizó un alambre de platino.

2.4.2.3.4 Electrodo de Trabajo:

Para todos los análisis realizados se utilizó un electrodo de teflón con punta de Oro de 0.5 mm de diámetro, el cual se somete a un proceso de pulido con alúmina (Al_2O_3) 0.3 μm y agua des ionizada haciendo movimientos en forma de ocho.

Para eliminar impureza incrustadas en la superficie del electrodo de trabajo producto de mediciones anteriores se realiza una Cronoamperometría en medio ácido con ácido nítrico 0.2 M aplicando un potencial positivo de 2.4 V por 20 s.

Finalmente, al terminar la limpieza del electrodo de trabajo se realiza una activación y verificación de los potenciales de oxidación y reducción del mismo, mediante la aplicación de una Voltametría cíclica en presencia de 0.5nM de Ferricianuro de potasio. Potenciales de -0.1 a 0.5 V.

2.4.3 Preparación de solución buffer de Tiourea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) 0.01 M y Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)0.0035 M

Se preparó una solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M, pesando 0.7614g de Tiourea y una adición de 200uL de ácido sulfúrico aforado en un balón volumétrico de 1000ml con agua des ionizada, procurando la correcta homogenización, posteriormente a la solución se ajustó un pH de 2.4.

2.4.4 Preparación de solución patrón de cadmio

Se prepara 10 mg/L (ppm) de Cadmio a partir de una solución estándar de 1000 mg/L (ppm), para lo cual se coloca 1ml de la solución estándar de Cd en un balón volumétrico de 100 ml, el cual se afora con agua des ionizada y posteriormente se homogeniza la solución.

2.4.5 Preparación de muestras sintéticas de Cadmio

A partir de la solución patrón de cadmio se preparan disoluciones de 0.01, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/L (ppm), en balones volumétricos de 25ml enrasados con la solución electrolítica de Tiourea y ácido sulfúrico, como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5: Diluciones de Cadmio para determinación por SWV.

Concentraciones de Cadmio (ppm)	Solución electrolítica de Tiourea y Ácido Sulfúrico pH 2.4
0.01	25 ul Cd + Solución electrolítica
0.05	125 ul Cd + Solución electrolítica
0.2	500 ul Cd + Solución electrolítica
0.4	1000 ul Cd+ Solución electrolítica
0.6	1500 ul Cd + Solución electrolítica
0.8	2000 ul Cd + Solución electrolítica
1	2500 ul Cd + Solución electrolítica

Fuente: Elaboración propia

2.4.6 Preparación de muestras de almendras de Cacao

2.4.6.1 Digestión ácida adaptada para determinación de Cd en almendras de Cacao

De acuerdo a la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC) 999.11, el proceso de digestión ácida se realiza para determinación de metales pesados como: cadmio, plomo, zinc, cobre y hierro, lo cual establece que:

Para digerir las muestras calcinadas a cada crisol se le agrega 6ml de ácido clorhídrico (HCl) 6 M, asegurando que el reactivo cubra por completo la ceniza, posteriormente se somete a calentamiento en un hot plate a 150°C por una hora o hasta sequedad, se adiciona 15 ml de ácido nítrico (HNO₃) 0.1 M y se deja reposar por 2 horas. Se filtra la muestra haciendo lavados con 10 ml de ácido nítrico 0.1 M, el filtrado se enrasa con agua des ionizada en un balón volumétrico de 25 ml.

2.4.7 Análisis de muestras de almendras de cacao

En la celda electroquímica se colocó 5 ml de muestras digeridas, 10 ml de buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M y una adición estándar de 0.2 mg/ L (ppm) de Cd a partir de un patrón de Cd de 10 mg/L (ppm).

2.4.8 Parámetros óptimos para Voltametría de Onda Cuadrada

2.4.8.1 Efecto de la solución buffer de Tiourea 0.01M + ácido sulfúrico 0.0035M

El Efecto de la solución buffer mediante la técnica de Voltametría de onda cuadrada se observó utilizando un electrodo de trabajo de Oro en una solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M (pH 2.4), para evaluar 1 mg/L (ppm) de solución de Cadmio. El potencial aplicado para la técnica de SWV fue -1.3 y -0.2.

2.4.8.2 Efecto del pH en la solución Buffer

EL efecto del pH en la solución buffer de Tiourea 0.01M + ácido sulfúrico 0.0035 M, se evaluó por la técnica de Voltametría de Onda Cuadrada utilizando un electrodo de trabajo de Oro en presencia de 1 mg/L (ppm) de solución de Cadmio a niveles de pH variados entre 2.4, 1.8 y 4.2. Figura 13.

2.4.8.3 Efecto de la frecuencia

La frecuencia es uno de los principales parámetros a determinarse en la Voltametría de onda cuadrada ya que brinda simetría y altura al voltagrama y a su vez influye en la velocidad del proceso electroquímico, generando información sustancial de la sensibilidad de la técnica. Las pruebas de frecuencia aplicadas fueron de 20, 40 y 60 Hz en presencia de 1 mg/L (ppm) de solución de Cadmio y solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M. Figura 14.

2.4.8.4 Efecto del pulso de amplitud

El pulso de amplitud o tamaño de pulso se varió de 20, 40 y 60 mV, en presencia de 1 mg/L (ppm) de solución de Cadmio y solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M, con el fin de determinar los milivoltios que soporte el proceso electroquímico sin saturar la superficie del electrodo. Figura 15.

2.4.8.5 Efecto del tamaño de paso

Al incrementar la magnitud del tamaño de paso, contribuye a un aumento entre los espacios graficados en el voltagrama, permitiendo de esta manera visualizar una línea de puntos más distantes y menos corrugados. Se tomaron tamaños de paso de 10, 20, 40 y 50mV en presencia de 1 mg/L (ppm) de solución de Cadmio y solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M. Figura 16.

2.4.8.6 Determinación Electroquímica de Cadmio

Mediante la técnica de Voltametría de Onda Cuadrada (SWV) se obtuvo la curva de calibración a diferentes concentraciones de Cadmio. En la Figura 16 se definen los parámetros establecidos por SWV. Se prepararon diluciones de cadmio de 0.01, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/L (ppm) (Figura 17), de cada dilución se realizaron 5 repeticiones con el propósito de obtener un promedio de corriente, para así construir la curva de calibración y a su vez dar origen a la ecuación de la recta.

2.4.8.7 Aplicación del Electrodo teflón dopado con punta de Oro en muestras de almendras de Cacao

Los análisis de las muestras digeridas de almendras de Cacao se realizaron por triplicado con una adición de 0.2 mg/L (ppm) de Cadmio

2.5 Análisis Estadístico

Las compilaciones de los datos obtenidos en la presente investigación se realizaron mediante la aplicación del programa estadístico IBM SPSS 25, en donde se realizaron los respectivos análisis como: pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk), pruebas de homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene, prueba de varianza (ANOVA de un factor).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Parámetros óptimos para Voltametría de Onda Cuadrada

3.1.1 Efecto del pH en la solución Buffer

El efecto del pH en la respuesta electroquímica se evaluó a diferentes niveles de pH: 4.2, 2.4 y 1.8, utilizando la solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M con 1 mg/L (ppm) de Cd.

Se identificó que a un pH de 2.4 se da una mejor respuesta electroquímica con respecto a la solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M, mostrando una curva pronunciada con un pico alto, además de colocarse en el potencial característico del Cd entre -0.60 a -0.75. Por lo tanto, todos los análisis se desarrollaron con el buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M a un pH de 2.4, como lo muestra la Figura 12.

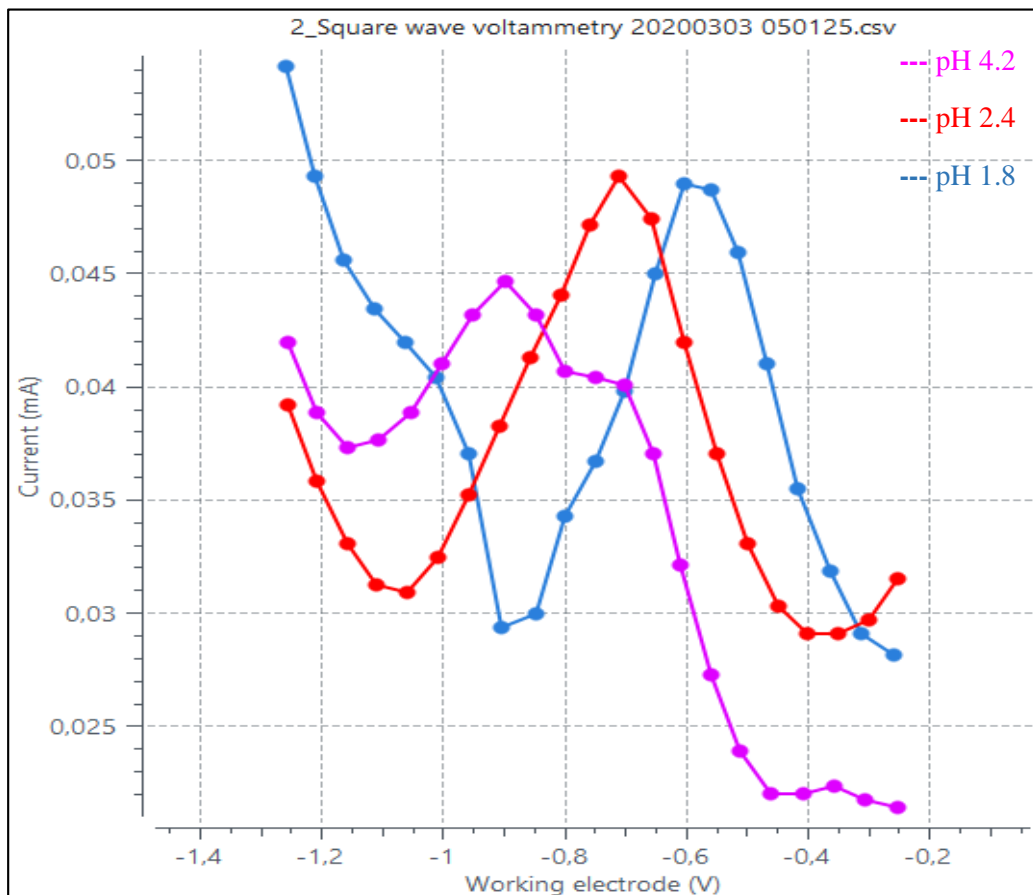


Figura 12: Voltagrama de SWV comparando pH (4.2, 2.4 y 1.8), en una solución de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M en presencia de 1 mg/L (ppm) de Cd. Condiciones de la SWV: $f = 60\text{Hz}$; $\Delta E_p = 60\text{mV}$; $\Delta E_s = 50\text{mV}$.

Fuente: Elaboración propia

3.1.2 Efecto de la frecuencia (f)

El efecto de la frecuencia en la respuesta electroquímica se evaluó a diferentes niveles de frecuencia utilizando la solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M con 1 mg/L de Cd.

En la Figura 13, se evidenció, que 60 Hz es la frecuencia más adecuada en esta configuración, ya que permite obtener una mejor respuesta electroquímica, con un pico más elevado, y a frecuencias inferiores como 40 y 20 Hz muestra voltagramas menores. Sin embargo, también se realizó una prueba con 80 Hz dando un pico más elevado que el de 60 Hz, pero al variar concentraciones se observó que a pesar de tener mayor magnitud su respuesta no tenía continuidad de decrecimiento de la corriente de acuerdo a las concentraciones establecidas, lo cual se debía a que estaba alcanzando un alto grado de saturación en la superficie del electrodo. Por lo tanto, todos los análisis se llevaron a cabo con una frecuencia de 60 Hz misma que presento continuidad de acuerdo a las concentraciones que decrecían de 1 a 0.01 mg/L (ppm).

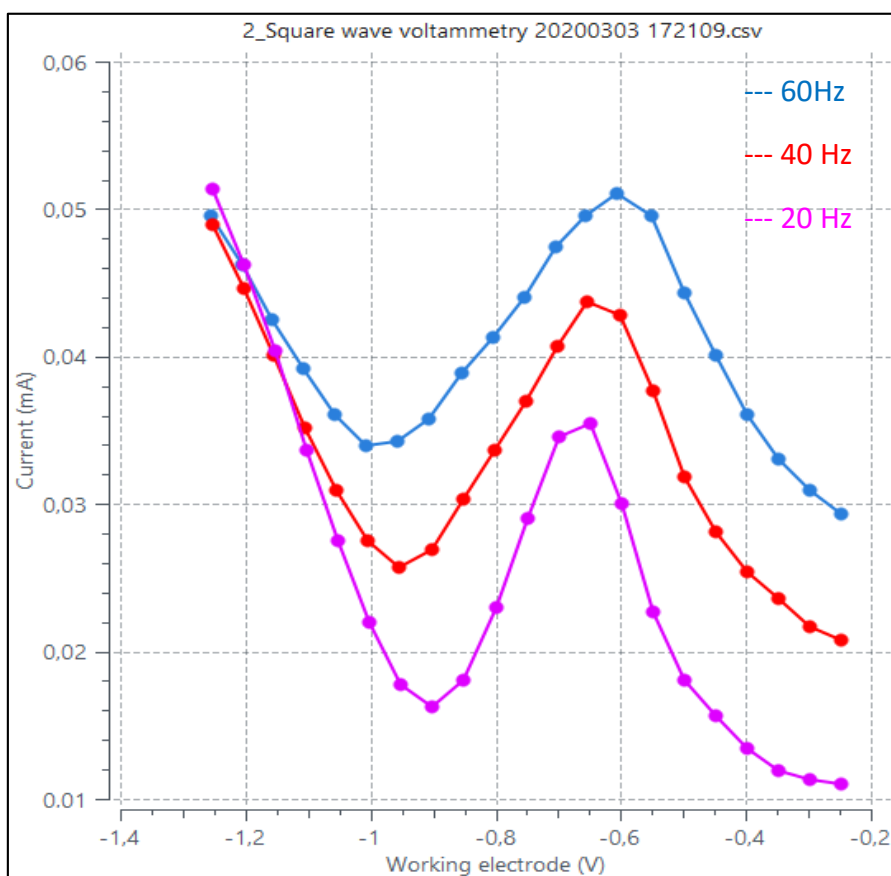


Figura 13: Voltograma de SWV comparando f (20, 40 y 60 Hz), en una solución de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M en presencia de 1 mg/L (ppm) de Cd. Condiciones de la SWV; $\Delta E_p = 60\text{mV}$; $\Delta E_s = 50\text{mV}$ y $f = 60, 40$ y 20Hz.

Fuente: Elaboración propia

3.1.3 Efecto del pulso de amplitud (ΔE_p)

El efecto del pulso de amplitud o tamaño de pulso en la respuesta electroquímica se evaluó a diferentes niveles utilizando la solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M con 1 mg/L (ppm) de Cd.

Se logró obtener una adecuada respuesta electroquímica a 60mV, obteniendo un voltograma bien definido ubicado en el potencial de oxidación del analíto, mientras que a valores inferiores no se da una curva con elevación prolongada y tampoco bien definida. Por lo tanto, los análisis se desarrollaron con un tamaño de pulso de 60mV, el cual al es el valor más alto soportado por el montaje electroquímico sin que se dé la saturación del electrodo, como se muestra en la Figura 14.

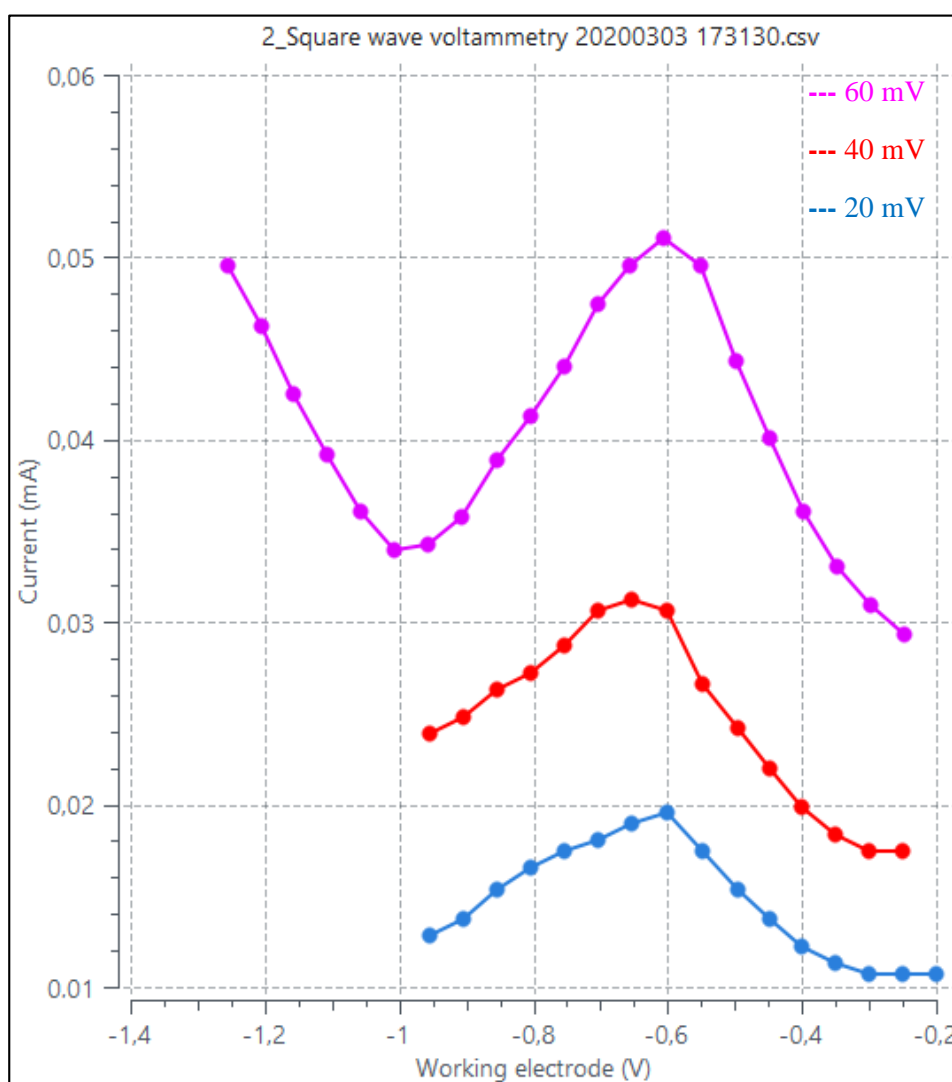


Figura 14: Voltagrama de SWV comparando ΔE_p : 20, 40 y 60 Hz, en una solución de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M en presencia de 1 mg/L (ppm) de Cd. Condiciones de la SWV; $\Delta E_s=50\text{mV}$ y $f=60\text{Hz}$ y $\Delta E_p=20, 40$ y 60mV .

Fuente: Elaboración propia

3.1.4 Efecto del tamaño de paso (ΔE_s)

El efecto del tamaño de paso en la respuesta electroquímica se evaluó a diferentes niveles utilizando la solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M con 1 mg/L (ppm) de Cd.

Se identificó una clara respuesta electroquímica a 50mV, como se muestra en la figura 15, ya que se obtiene un voltagrama con mayor espacio entre los puntos y una línea más fina y menos corrugada con mayor cantidad de puntos, a diferencia de los valores inferiores que arrojaron voltagramas con puntos corrugados. Por lo tanto, en este parámetro se seleccionó 50mV como el más adecuado.

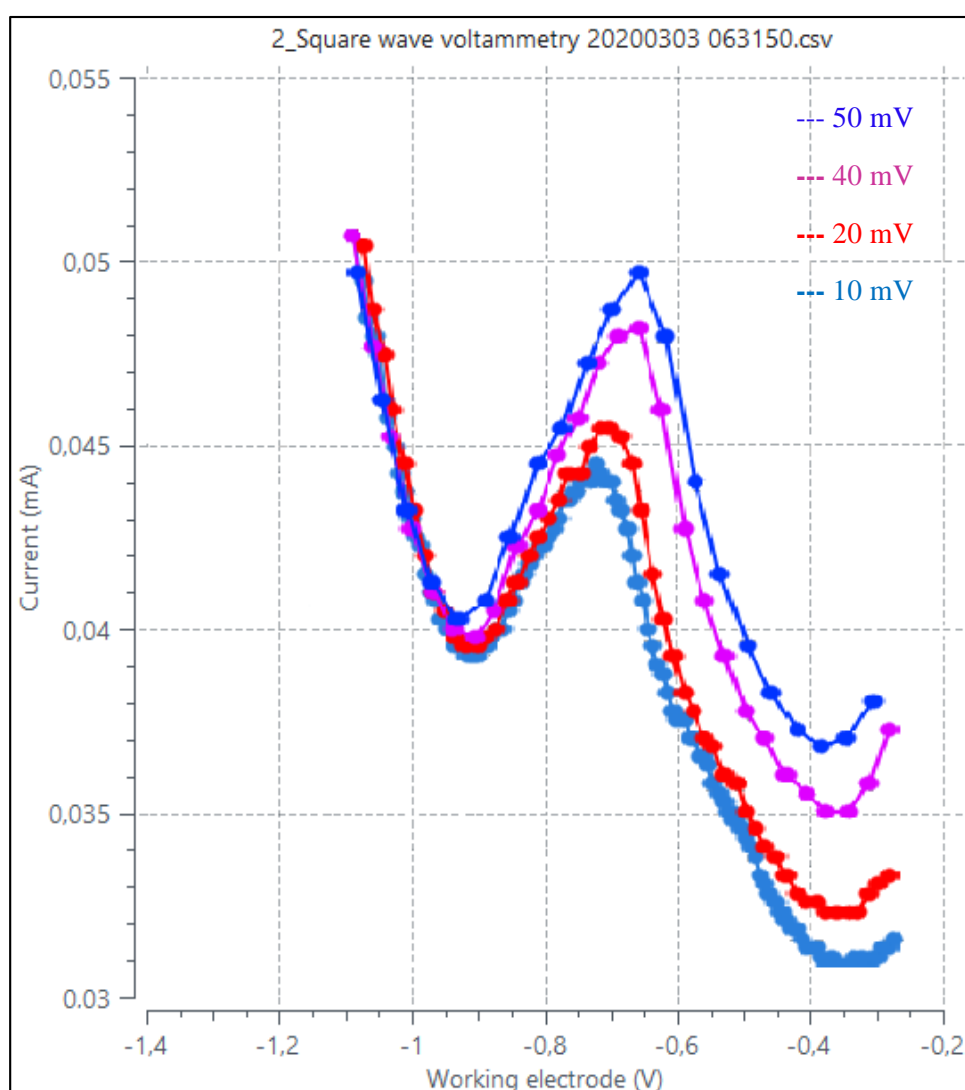


Figura 15: Voltagrama de SWV comparando ΔE_s : 10, 20, 40 y 50 mV, en una solución de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M, en presencia de 1 mg/L (ppm) de Cd. Condiciones de la SWV; $f=60\text{Hz}$ y $\Delta E_p=20, 40, 60\text{mV}$ y $\Delta E_s=10, 20, 40$ y 50mV .

Fuente: Elaboración propia

3.1.5 Efecto de la concentración de Cadmio para Validación de Método Voltamperometrico por SWV

Para la validación de la técnica se utilizó un electrodo de Oro en una la solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M pH 2.4, obteniendo un voltagrama por SWV, como se muestra a continuación en la Figura 17.

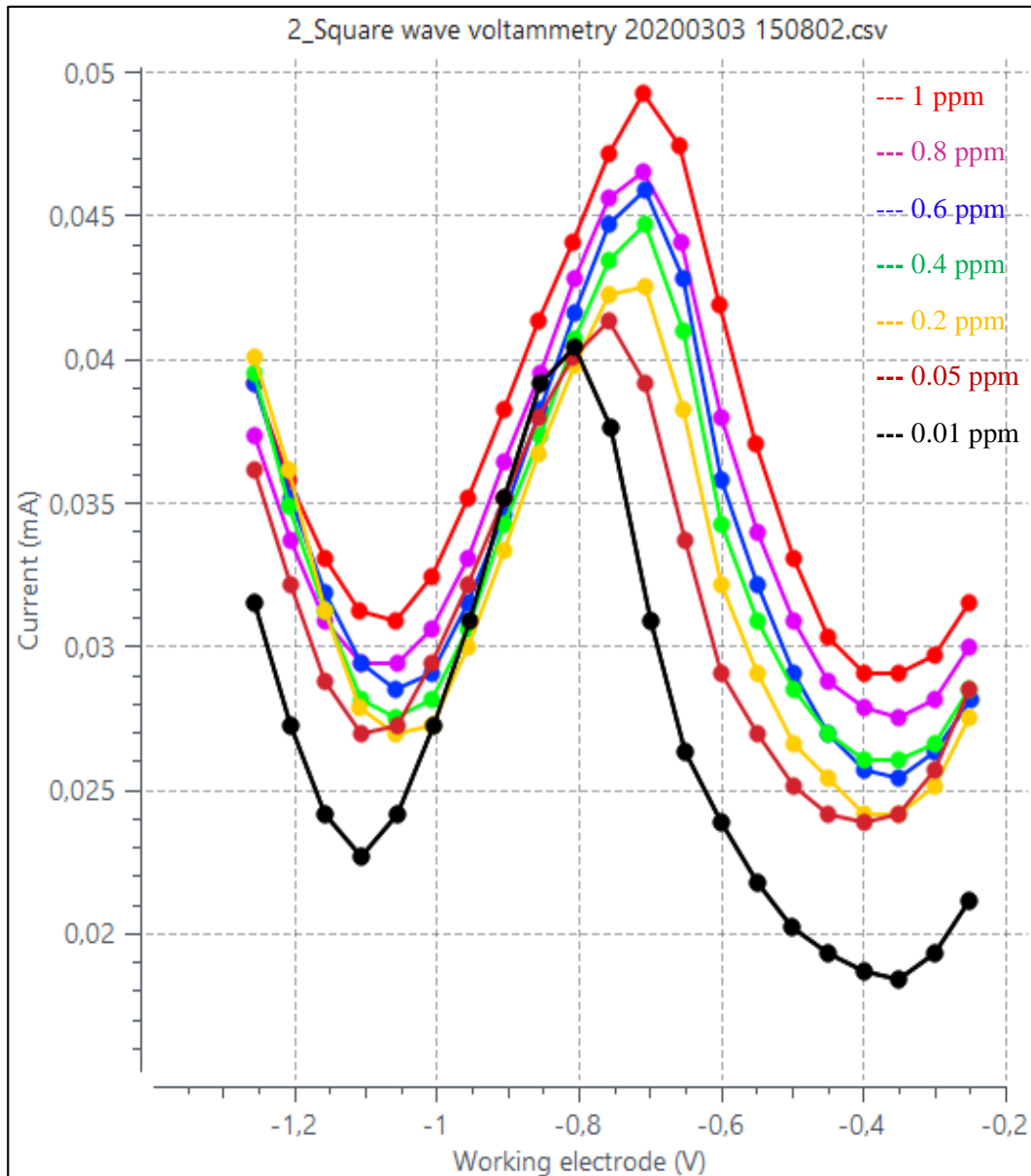


Figura 16: Voltagrama de SWV a diferentes concentraciones de Cd en una solución de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M. Parámetros: $f= 60\text{Hz}$; $\Delta E_p= 60\text{mV}$; $\Delta E_s=50\text{mV}$, considerados los más óptimos, a concentraciones de 0.01, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/L (ppm).
Fuente: Elaboración propia

La linealidad del método se determinó mediante 5 repeticiones de muestra sintética de concentraciones: 0.01, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/L (ppm) (Tabla 6), utilizando la solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M pH 2.4, permitiendo obtener un óptimo coeficiente de determinación y correlación $R^2 = 0.997$, con una pendiente (m) de 0.0091 y un intercepto de 0.0409, (Figura 18). Por lo tanto, se establece que el método tiene una óptima sensibilidad al evidenciarse una mayor pendiente y un incremento proporcional entre la concentración del analito (Cd) y la intensidad de corriente (mA), mostrando una linealidad de la curva a lo largo de la pendiente. Permitiendo la construcción de la curva de calibrado.

La ecuación de la recta se define como: $Y = 0.0091 X + 0.0409$. **Ec.7**

Tabla 6: Repeticiones de intensidad de corriente de concentraciones de Cd variadas para construcción de la Curva de Calibrado

Repeticione s	Intensidad de Corrientes de Concentraciones de Cadmio (ppm)						
	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,05	0,01
1	0,04960	0,04802	0,04588	0,04466	0,04282	0,04130	0,04038
2	0,05026	0,04894	0,04680	0,04496	0,04251	0,04133	0,04055
3	0,04985	0,04741	0,04588	0,04435	0,04251	0,04139	0,04037
4	0,05016	0,04802	0,04680	0,04466	0,04221	0,04139	0,04037
5	0,04985	0,04781	0,04649	0,04480	0,04282	0,04166	0,04098
Media	0,04994	0,04804	0,04637	0,044686	0,04257	0,04141	0,04053

Fuente: Elaboración propia

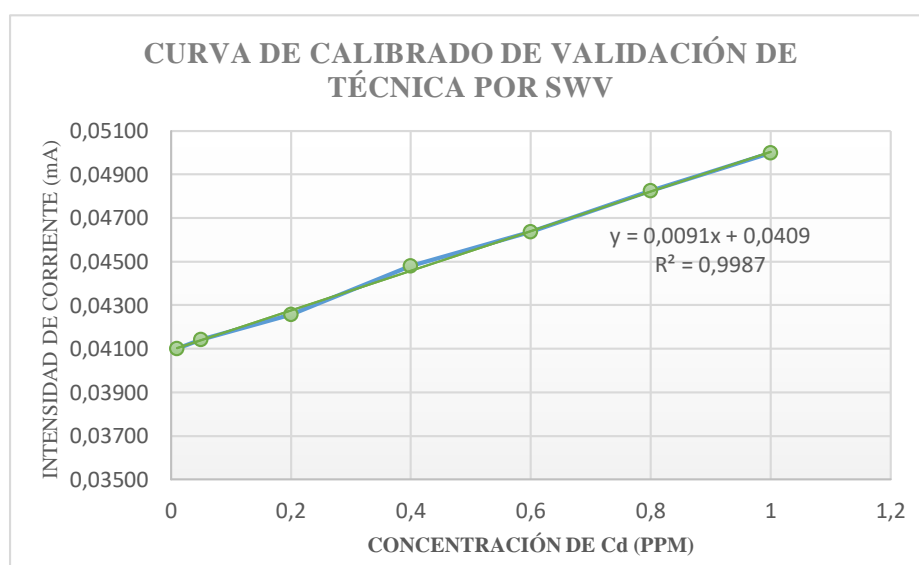


Figura 17: Curva de Calibración de muestras sintéticas para detección de Cadmio mediante SWV.

Fuente: Elaboración propia

3.1.5.1 Precisión

La precisión de la técnica se determinó mediante el análisis de 7 concentraciones de Cadmio de 0.01 a 1 ppm, como lo indica la Tabla 7, dichas concentraciones se utilizaron para calcular la desviación estándar relativa y el coeficiente de variación, obteniendo como resultado un %CV de 0.47% el cual indica que la precisión del método es aceptable de acuerdo a los criterios de consideración establecidos.

Tabla 7: Resultados de Precisión de la técnica Voltamperométrica de SWV

Repeticiones	Intensidad de Corriente de Concentraciones de Cadmio							Total
	1 ppm	0,8 ppm	0,6 ppm	0,4 ppm	0,2 ppm	0,05 ppm	0,01 ppm	
1	0,04980	0,04802	0,04588	0,04466	0,04282	0,04130	0,04076	
2	0,05026	0,04894	0,04680	0,04496	0,04251	0,04133	0,04079	
3	0,04985	0,04851	0,04588	0,04495	0,04251	0,04139	0,04080	
4	0,05016	0,04802	0,04680	0,04466	0,04221	0,04139	0,04078	
5	0,04985	0,04781	0,04649	0,04480	0,04282	0,04166	0,04078	
Media	0,04998	0,04826	0,04637	0,044806	0,04257	0,04141	0,04078	0,04488
Sb	0,00019	0,00041	0,00042	0,00013	0,00023	0,00013	0,00001	0,00022
%CV	0,38	0,85	0,90	0,29	0,54	0,31	0,03	0,47

Fuente: Elaboración propia

3.1.5.2 Exactitud

Para evaluar la exactitud del método se realizó el análisis a 7 concentraciones de Cadmio de 0.01 a 1 ppm obteniendo un total de 35 muestras sintéticas, con el fin de determinar el porcentaje de recuperación, se realizaron los calculo pertinentes obteniendo una recuperación total de 103.17%, el cual permite considerar una exactitud aceptable y confiable, como lo indica la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados de Exactitud del Método SWV

Concentraciones de Cd (ppm)	Media de Concentraciones Calculada (ppm)	%R
1	1,00	99,78
0,8	0,81	101,10
0,6	0,60	100,18
0,4	0,43	107,42
0,2	0,18	91,76
0,05	0,06	112,09
0,01	0,01	109,89
Recuperación total		103,17

Fuente: Elaboración propia

3.1.5.3 Límite de Cuantificación y Límite de Detección

Para determinar los límites de cuantificación y detección se realizaron análisis al blanco mediante 5 repeticiones del mismo, además se utilizó la pendiente de validación del método Voltamperométrico por SWV, obteniendo como resultado un L.C de 0.01 y L.D de 0.004, como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9: Resultados de Limite de Cuantificación y Detección

m	Intensidad de corriente del Blanco (mA)					Media	Sb	L.C	L.D
0,0091	0,01238	0,01236	0,01236	0,01235	0,01234	0,0124	0,000013	0,01	0,004

Fuente: Elaboración propia

3.1.6 Determinación de Cadmio en Almendras de Cacao

Para la determinación de Cadmio en almendras de cacao se utilizaron muestras provenientes de dos fincas productoras de cacao Nacional e Injerto, haciendo tres replicas por cada tipo de Cacao, como se indica en la tabla 10.

Tabla 10: Muestras de almendras de Cacao Nacional e Injerto.

	N. Muestras	Muestras
Finca 1	3	Cacao Nacional
	3	Cacao Injerto
Finca 2	3	Cacao Nacional
	3	Cacao Injerto

Fuente: Elaboración propia

3.1.6.1 Aplicación del Electrodo de teflón dopado con punta de Oro en muestras de almendras de Cacao

Utilizando un electrodo de Oro en una la solución buffer de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M pH 2.4, se realizaron los análisis a las diferentes muestras de almendra de cacao nacional e injerto digeridas. Se colocó en la celda electroquímica 5ml de muestra + 10ml de buffer + adición estándar de 0.2mg/L (ppm) de patrón de cadmio, permitiendo obtener el voltagrama por SWV que se muestra en la Figura 18.

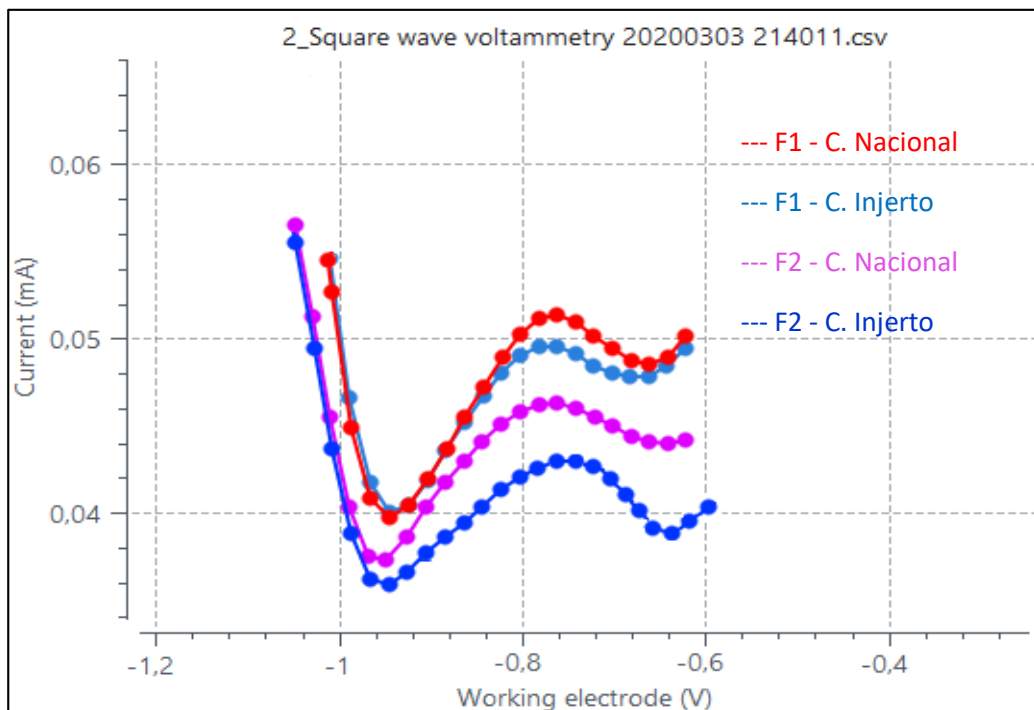


Figura 18: Voltograma de SWV en muestras digeridas de almendras de Cacao, con una solución de Tiourea 0.01 M + ácido sulfúrico 0.0035 M. Parámetros: $f= 60\text{Hz}$; $\Delta E_p= 60\text{mV}$; $\Delta E_s=50\text{mV}$, considerados los más óptimos, a concentraciones de 0.01, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/L (ppm).

Fuente: Elaboración propia

El voltograma arrojado por la SWV indica la respuesta de las intensidades de corriente de cada muestra de cacao, observando la detección del analito (Cd) mediante la curva en el potencial de oxidación establecido entre -0.60 a -0.75.

3.1.6.2 Cuantificación de Cadmio en Almendras de Cacao digeridas

Se determinó la concentración de cadmio en 4 muestras de almendras de Cacao digeridas, se realizaron análisis por triplicado, mediante la técnica Voltamperométrica de Voltametría de Onda Cuadrada (SWV). Para la obtención de la concentración real de cadmio se restó a la lectura del equipo la media de la adición estándar de (0,2mg/L Cd) en cada muestra y se aplicaron las siguientes ecuaciones (Ec.8), (Ec.9) y (Ec.10), ya que, al ser una muestra seca requiere expresar la concentración de Cd en unidades de mg/Kg (ppm).

Ec.8

$$\text{Conc. Sol. Cd} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Conc. Cd}(\text{mg/L}) \times (\text{alicuota } 5 \text{ ml de muestra} + 10 \text{ ml de Buffer})}{10 \text{ ml de Buffer}}$$

Ec.9

$$\text{mg Cd} = \text{Conc. Sol. Cd} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times L \text{ de muestra total filtrada}$$

Ec.10

$$\frac{mg}{Kg} (ppm)Cd = \frac{mg Cd}{mg F. seco} \times \frac{mg F. seco}{100 mg F.} \times \frac{1 \times 10^6 mg}{1 Kg}$$

Para la cuantificación de Cd se utilizó la Ec.7 correspondiente a la validación de la técnica voltamperométrica por (SWV), constituida por la pendiente de 0,0091 y el intercepto de 0,0409, la misma que nos ha permitido obtener la concentración de Cd en unidades de mg/L, por consiguiente, se aplicaron las ecuaciones: Ec.8, Ec.9 y Ec.10, obteniendo concentraciones de Cd (mg/Kg) en almendra de caco nacional e injerto de ambas fincas, las cuales se encuentran descritas en la Tabla 11, Tabla 12, Tabla 13 y Tabla 14.

Tabla 11: Concentración de Cadmio en almendras de Cacao Nacional procedentes de la Finca 1.

m	Y	\bar{X} (0,2 mg/L)	P. Seco de muestras (mg)	Lectura de equipo (mg/L)	Conc. de Cd (mg/L)	Conc. Total de Cd (mg/Kg)	\bar{X}
0,0091	0,0409	0,19	10013,4	0,94	0,75	0,28	0,3
			10021,9	1,12	0,93	0,34	
			10000,4	0,99	0,8	0,3	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 12: Concentración de Cadmio en almendras de Cacao Injerto procedentes de la Finca 1.

m	y	\bar{X} (0,2 mg/L)	P. Seco de muestras (mg)	Lectura de equipo (mg/L)	Conc. de Cd (mg/L)	Conc. Total de Cd (mg/Kg)	\bar{X}
0,0091	0,0409	0,19	10021,9	0,88	0,69	0,26	0,27
			10033,3	1,12	0,75	0,28	
			10007,1	0,93	0,74	0,27	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 13: Concentración de Cadmio en almendras de Cacao Nacional procedentes de la Finca 2.

m	y	\bar{X} (0,2 mg/L)	P. Seco de muestras (mg)	Lectura de equipo (mg/L)	Conc. de Cd (mg/L)	Conc. Total de Cd (mg/Kg)	\bar{X}
0,0091	0,0409	0,19	10012,1	0,58	0,39	0,14	0,14
			10007,6	0,54	0,35	0,13	
			10003,8	0,56	0,37	0,14	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 14: Concentración de Cadmio en almendras de Cacao Injerto procedentes de la Finca 2.

m	y	\bar{X} (0,2 mg/L)	P. Seco de muestras (mg)	Lectura de equipo (mg/L)	Cant. De Cd (mg/L)	Conc. Total de Cd (mg/Kg)	\bar{X}
0,0091	0,0409	0,19	10013,6	0,3	0,11	0,04	0,05
			10067,0	0,34	0,15	0,06	
			10003,2	0,33	0,14	0,05	

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 15, se visualizan los resultados obtenidos mediante la técnica voltamperométrica (SWV), evidenciando las concentraciones de cada especie de cacao: nacional e injerto, siendo la Finca 1 donde se observa una mayor concentración de cadmio con niveles de 0,3 mg/Kg (ppm) para cacao nacional y de 0,27 mg/Kg (ppm) para cacao injerto, mientras que en la Finca 2 se obtuvo concentración menor de 0,14 mg/Kg (ppm) para cacao nacional y una concentración mucho menor para cacao injerto de 0.05 mg/Kg (ppm).

Tabla 15: Concentración de Cd en almendras de Cacao Nacional e Injerto.

N. de Muestras	Concentración de Cd en almendra de cacao (ppm)			
	Finca 1		Finca 2	
	Nacional	Injerto	Nacional	Injerto
1	0,28	0,26	0,14	0,04
2	0,34	0,28	0,13	0,06
3	0,30	0,27	0,14	0,05
Media	0,3	0,27	0,14	0,05

Fuente: Elaboración propia

La diferencia de concentraciones de Cd entre la Finca 1 y la Finca 2 se debe a que la Finca 1 se encuentra más cerca del río Santa Rosa, mismo que está contaminado con metales pesados como Cadmio, debido a las actividades metalúrgicas que se llevan a cabo en sectores aledaños a la Finca 1, la cual utiliza el agua del río como recurso principal de riego para las plantaciones de Cacao, en cuanto a la Finca 2 se encuentra más alejada del río aproximadamente 4 kilómetros y es poco frecuente el uso del agua del río Santa Rosa, por tal razón contiene una concentración menor de este metal. Sin embargo, existe una diferencia mínima de concentración de Cd entre el cacao nacional e injerto de la Finca 2 lo cual se debe a que ambas especies de Cacao están separadas unas de las otras.

Cabe destacar que ambas fincas fueron regadas con agua del río Santa Rosa, sin embargo, por las lluvias de la temporada, fue menor el riego que se dio a las plantaciones de Cacao con agua del Río. Por lo tanto, los niveles de Cd en almendra de cacao no superan los límites permisibles del reglamento de la Unión Europea (UE), y, por el contrario, las almendras de cacao a excepción del injerto de la finca 2 superan los límites permisibles de la comisión del Codex Alimentario (CAC) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) descritos en la Tabla 16.

Tabla 16: Comparación de Concentraciones de Cadmio con Límites permisibles por las diferentes Normas Reguladoras.

	Muestras de Cacao	Concentración de Cadmio (mg/Kg)	Reglamento (UE) Comisión Europea (CE) (mg/Kg)	Comisión de Códex Alimentarius (CAC) (mg/Kg)	Organización Mundial de la Salud (OMS) (mg/Kg)
Finca 1	Nacional	0,30	0,6	0,1	0,1
	Injerto	0,27			
Finca 2	Nacional	0,14			
	Injerto	0,05			

Fuente: Elaboración propia.

La norma ecuatoriana NTE INEN 621:2010 establece límites permisibles de metales pesados como arsénico (As), cobre (Cu), hierro (Fe) para productos procesados de Cacao como el Chocolate, pero no se han dado límites específicos para cadmio (Cd) en almendras de cacao. Sin embargo, en el 2008 el Consorcio de Consejos Provinciales del Ecuador (CONCOPE) y la Sociedad Alemana de Cooperación Técnica indica niveles máximos permisibles de 0.05 ppm de Cd en almendras de cacao⁶⁰.

En relación con la investigación realizada por Sofía Acosta y Pablo Pozo en 2013⁶⁰, en la determinación de Cd en almendras de cacao, se encontraron niveles de 0,35 mg/Kg (ppm) en fincas ubicadas a lo largo de la vía Santo Domingo, obteniendo un 97.8 % Recuperación el cual difiere con el encontrado en la presente investigación que fue de 103.17%, lo cual se debe a que el autor desarrolló un método distinto de Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

Así mismo, en una investigación realiza en el Cantón Vinces de la provincia de los Ríos por Lauro E. Díaz en 2018⁶, en la cuantificación de cadmio en almendra de cacao, se obtuvo un promedio de concentración de 0.455 mg/Kg (ppm) de Cd superando a los obtenidos en la presente investigación, lo cual se debe a las constantes actividades antropogénicas del hombre.

Es importante dejar claro que las investigaciones citadas anteriormente fueron realizadas mediante el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica en hornos de grafito, mientras que el presente estudio se realizó mediante la técnica voltamperométrica de voltametría de onda cuadrada (SWV).

Por último, en una investigación realizada en Colombia por Ivan Niño en 2015², aplicando la técnica voltamperométrica de SWV para cuantificación de cadmio en

almendras cacao, obtuvo concentraciones de 1.5 y 2,8 mg/Kg (ppm), siendo superior a los niveles encontrados en la presente investigación, el autor utilizó un electrodo de mercurio en una solución buffer de Britton Robinson.

3.1.7 Análisis estadísticos

3.1.7.1 Análisis de normalidad (Shapiro-Wilk)

Debido a que el número de muestra es menor a 30 se analizó la prueba de normalidad de normalidad de Shapiro-Wilk obteniendo una significancia $> 0,05$ lo cual indica la aceptación de la hipótesis nula demostrando que los datos proceden de una distribución normal en todas las muestras de cacao con una excepción de la muestra de cacao nacional de la finca 2, como se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17: Análisis de Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk.

		Pruebas de normalidad		
		Especie	Estadístico	Shapiro-Wilk
				gl.
Concentraciones	F1 Nacional	,964	3	,637
	F1 Injerto	1,000	3	1,000
	F2 Nacional	,750	3	,000
	F2 Injerto	1,000	3	1,000

Fuente: Elaboración propia

3.1.7.2 Análisis de homogeneidad de varianzas

Para determinar la igualdad de varianzas se realizó la prueba del estadístico de Levene tomando a la media como el valor principal el cual es 3,080 el mismo que da una significancia de 0,090, siendo $> 0,05$ indicando que se acepta la hipótesis nula, demostrando que no se da una diferencia significativa de las varianzas muestrales, como se indica en la Tabla 18.

Tabla 18: Análisis de homogeneidad de varianza mediante Prueba de Levene.

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Concentraciones	Se basa en la media	3,080	3	8	,090
	Se basa en la mediana	1,311	3	8	,336
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,311	3	3,061	,412
	Se basa en la media recortada	2,941	3	8	,099

Fuente: Elaboración propia

3.1.7.3 Análisis de ANOVA

Para evaluar si las medias de las muestras son iguales se realizó un análisis de varianza ANOVA obteniendo el valor de estadístico de prueba $F= 145,552$ mismo que es significativamente distinto de 1, y está acompañado de su nivel de significancia el cual es $< 0,05$ por ello se rechaza la hipótesis nula la cual se basa en la igualdad de las medias descrita en la Tabla 19, indicando que las concentraciones de Cd son distintas para cada especie de cacao, Figura 20.

Tabla 19: Análisis de varianza por ANOVA de un factor.

ANOVA					
Concentraciones	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,127	3	,042	145,552	,000
Dentro de grupos	,002	8	,000		
Total	,130	11			

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a los datos arrojados, la investigación permite deducir que a un nivel de confianza del 95%, si existe diferencia significativa en los datos obtenidos de las concentraciones de Cadmio en almendras de cacao nacional e injerto, mediante la técnica Voltamperométrica de SWV.

Por consiguiente, la Figura 20, mediante un diagrama de caja y bigote, proporciona información sobre la dispersión de los datos, observando que el ancho de la caja nos indica la dispersión de concentración de cada especie de cacao, identificando que el Cacao Nacional de la Finca 1 presenta una mayor variabilidad en sus concentraciones.

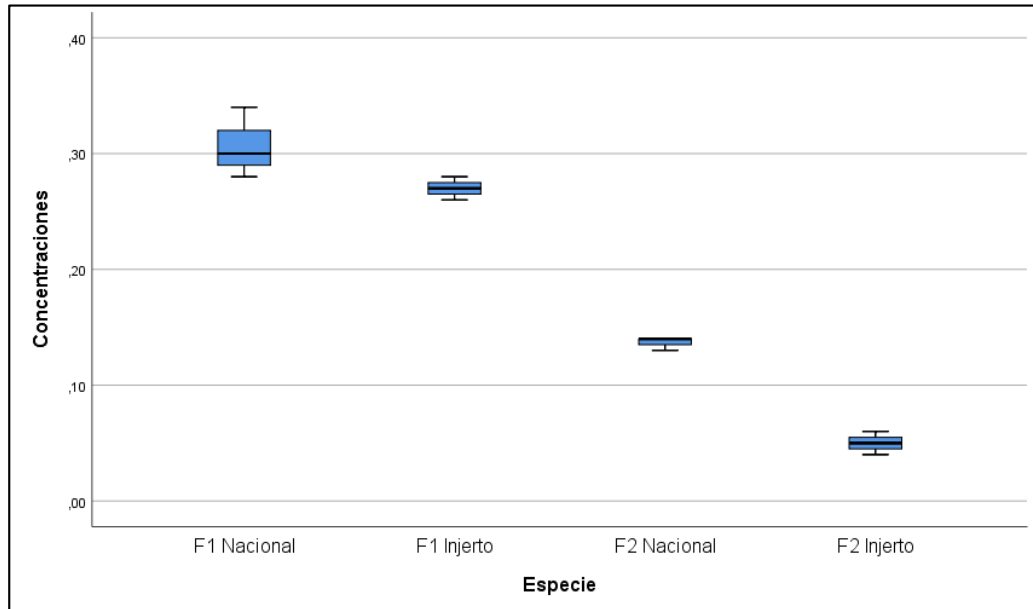


Figura 19: Dispersión de las concentraciones de Cadmio mediante diagrama de Caja y bigote.
Fuente: Elaboración propia.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- La toma de muestra se realizó en dos fincas del Cantón Santa Rosa, llevándose a cabo una recolección aleatoria de ambas especies de cacao (Nacional e Injerto), posteriormente se realizó un cuarteo de las almendras varias veces hasta obtener una muestra representativa para los respectivos análisis.
- Se desarrolló la técnica Voltamperométrica de voltametría de onda cuadrada (SWV), obteniendo resultados que permitieron la validación de la técnica brindando confiabilidad y alta sensibilidad, cumpliendo con parámetros de validación: exactitud precisión, linealidad, LD y LC.
- La cuantificación de cadmio (Cd) se realizó con un electrodo de trabajo de teflón dopado con punta de oro obteniendo resultados en la finca 1 de 0.30ppm para cacao nacional y 0.27ppm para cacao injerto, mientras en la finca 2 se encontraron concentraciones de 0.14ppm en cacao nacional y 0.05ppm para cacao injerto. Estas concentraciones se encuentran por debajo del límite permisibles de acuerdo a la normativa de la Unión Europea (UE) la cual establece un límite máximo de 0.6ppm, por otro lado, las concentraciones de Cd en ambas fincas superan los límites permisibles de 0.1ppm de las normas reguladoras: FAO/OMS y la Comisión Codex Alimentario a excepción del cacao injerto de la finca 2 el cual contiene una concentración de 0.05ppm.

4.2 Recomendaciones

- Ampliar estudios para la detección de cadmio en almendras de cacao mediante la técnica voltamperométrica de voltametría de onda cuadrada con electrodo de oro en diferente solución buffer para una mejor detección del analito.
- Desarrollar investigaciones para la determinación y cuantificación de cadmio de diversas fuentes de adsorción como en suelos y fuentes hídricas.
- Validar métodos voltamperométricos para la cuantificación de metales pesados en diferentes tipos de frutos y verduras.
- Para un mejor desarrollo académico se recomienda realizar vínculos universitarios, permitiendo el acceso a equipos e instrumentos para fomentar las investigaciones electroquímicas que ayuden a ampliar su desarrollo dentro del campo de la Ingeniería Química.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Acebo, M. Estudios Industriales y Orientación Estratégica Para La Toma de Decisiones Para La Industria de Cacao. *Espol* **2016**, 42.
- (2) Niño Bernal, I. D. Cuantificación de Cadmio En Cacao Proveniente Del Occidente de Boyacá Por La Técnica Analítica de Voltamperometría, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, 2015.
- (3) Larenas, D.; Fierro, V.; Fierro, C. Minería a Gran Escala: Una Nueva Industria Para Ecuador. *Polémika* **2017**, No. 12, 25.
- (4) La Comisión Europea. Reglamento (UE) No 488/2014 de La Comisión de 12 de Mayo de 2014 Que Modifica El Reglamento (CE) N° 1881/2006 Por Lo Que Respecta Al Contenido Máximo de Cadmio En Los Productos Alimenticios. *EFSA J.* **2016**, 9 (2), 10–14. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975>.
- (5) Fao, P. C.; Sobre, O. M. S.; Alimentarias, N.; Alimentarius, D. E. L. C. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias Comité Del Codex Sobre Contaminantes de Los Alimentos. **2005**, 4–9.
- (6) Díaz Ubilla, L. E.; Mendoza Hidalgo, E.; Bravo Bustamente, M.; Domínguez Vergara, N. Determinación de Cadmio y Plomo En Almendras de Cacao (*Theobroma Cacao*), Proveniente de Fincas de Productores Orgánicos Del Cantón Vinces. *Espirales Rev. Multidiscip. Investig.* **2018**, 2 (15).
- (7) Del Aguila Melendez, E. A. Determinación de Cadmio y Plomo En Granos de Cacao, Frescos, Secos y En Licor de Cacao (*Theobroma Cacao*), Universidad Nacional Agraria de la selva, 2017.
- (8) Sánchez Mora, F. D.; Mariela Medina Jara, S.; Díaz Coronel, G. T.; Ramos Remache, R. A.; Vera Chang, J. F.; Vásquez Morán, V. F.; Troya Mera, F. A.; Garcés Fiallos, F. R.; Onofre Nodari, R. Potencial Sanitario y Productivo de 12 Clones de Cacao En Ecuador. *Rev. Fitotec. Mex.* **2015**, 38 (3), 265–274.
- (9) Luna, F.; Crouzillat, D.; Cirou, L.; Bucheli, P. Chemical Composition and Flavor of Ecuadorian Cocoa Liquor. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (12), 3527–3532. <https://doi.org/10.1021/jf0116597>.
- (10) Álvarez Andrade, J. R. Acumulación de Metales Pesados (Pb y Cd) En Almendras de Cacao Durante El Proceso de Fermentación y Secado, Instituto Politécnico de Leira, 2018.
- (11) Amores, F.; Palacios, A.; Jiménez, J.; Zhang, D. INIAP - Estación Experimental Pichilingue. **2009**, 100.
- (12) Morales Rodríguez, W. J.; Vallejo Torres, C. A.; Sinche Bósquez, P. D.; Torres Navarrete, Y. G.; Vera Chang, J. F.; Anzules Cedeño, E. D. Mejoramiento de Las Características Sensoriales Del Cacao CCN51 a Través de La Adición de Enzimas Durante El Proceso de Fermentación. *Rev. Amaz. Cienc. y Tecnol.* **2016**, 9.
- (13) Sánchez Campuzano, V. A. Caracterización Organoléptica Del Cacao (*Theobroma Cacao L.*), Para La Selección de Árboles Con Perfiles de Sabor de Interés Comercial, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2007.

- (14) Gil Quintero, J. A. Estabilidad y Actividad Antioxidante de Catequinas Presentes En Cacaos Colombianos Durante Los Procesos de Pre e Industrialización, Universidad de Antioquia, 2012. <https://doi.org/10.5334/ai.1615>.
- (15) Párraga Morán, D. E. Caracterización Físico-Químicas y Sensorial de Quince Clones de Cacao (Theobroma Cacao L.) Tipo Nacional En Almendras Fermentadas y Secas Para Oobtención de Pasta de Cacao, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2013.
- (16) CFN. Ficha Sectorial: Cacao y Chocolate GDGE-Subg. de Análisis de Información. *Rep. la Corporación Financ. Nac.* **2018**, 30.
- (17) Sosa Vera, A. Estudio Del Cacao Fino de Aroma, Univerddidad de los Hemisferios, 2019.
- (18) FHIA. *Producción de Plantas de Cacao Por Injerto*; Honduras, 2005.
- (19) Arévalo Gardini, E.; Arévalo Hernández, C. O.; Baligar, V. C.; He, Z. L. Heavy Metal Accumulation in Leaves and Beans of Cacao (Theobroma Cacao L.) in Major Cacao Growing Regions in Peru. *Sci. Total Environ.* **2017**, 605–606 (2017), 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>.
- (20) Mohamed, R.; Zainudin, B. H.; Yaakob, A. S. Method Validation and Determination of Heavy Metals in Cocoa Beans and Cocoa Products by Microwave Assisted Digestion Technique with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2020**, 303 (August 2019), 125392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125392>.
- (21) Rai, P. K.; Lee, S. S.; Zhang, M.; Tsang, Y. F.; Kim, K. H. Heavy Metals in Food Crops: Health Risks, Fate, Mechanisms, and Management. *Environ. Int.* **2019**, 125 (November 2018), 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>.
- (22) Hou, L. L.; Tong, T.; Tian, B.; Xue, D. W. *Crop Yield and Quality Under Cadmium Stress*; Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815794-7.00001-1>.
- (23) Robledo, L.; Castaño, A. Validación de La Metodología Para El Análisis de Los Metales Cadmio y Plomo En Agua Tratada Por Absorción Atómica Con Horno de Grafito En El Laboratorio de Análisis de Aguas y Aliemntos de La Universidad Tecnológica de Pereira, Universidad Tecnológica de Pereira, 2012.
- (24) Zhang, X.; Yang, L.; Li, Y.; Li, H.; Wang, W.; Ye, B. Impacts of Lead/Zinc Mining and Smelting on the Environment and Human Health in China. *Environ. Monit. Assess.* **2012**, 184 (4), 2261–2273. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2115-6>.
- (25) Chukwu, A.; Oji, K. Assessment of Pb, Zn, As, Ni, Cu, Cr and Cd in Agricultural Soils around Settlements of Abandoned Lead-Zinc Mine in Mkpuma Ekwoku, South-Eastern, Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* **2018**, 22 (9), 1485. <https://doi.org/10.4314/jasem.v22i9.21>.
- (26) Zhou, Z.; Chen, Z.; Pan, H.; Sun, B.; Zeng, D.; He, L.; Yang, R.; Zhou, G. Cadmium Contamination in Soils and Crops in Four Mining Areas, China. *J. Geochemical Explor.* **2018**, 192 (2017), 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.06.003>.

- (27) Chen, H.; Yuan, X.; Li, T.; Hu, S.; Ji, J.; Wang, C. Characteristics of Heavy Metal Transfer and Their Influencing Factors in Different Soil-Crop Systems of the Industrialization Region, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, *126*, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.042>.
- (28) Meter, A.; Atkinson, R.; LAbiberte, B. *Cadmio En El Cacao de America Latina y El Caribe*; 2019; Vol. 53.
- (29) Casa, N. M.; Río, L. A.; Sandalio, L. M. Toxicidad Del Cadmio En Plantas. *Ecosistemas* **2008**, *17* (3), 139–146. <https://doi.org/10.7818/re.2014.17-3.00>.
- (30) Camarena Valenzuela, M. A.; De la Cruz Canto, E. Cinética de Adsorción de Cd(II) En Soluciones Acuósas Emplenando Estiércol de Ganado Como Adsorbente. *Fac. Ingeniería Química Perú* **2017**, No. Ii, 1–229.
- (31) Carrasco Solis, E. Mediciones De Cadmio En Cacao. *INACAL* **2017**, 29.
- (32) Chira, J. Metales Biodisponibles En La Cuenca Alta Del Río Torres-Vizcarra, Departamentos de Ancash y Huánuco. *Univ. Nac. Mayor San Marcos* **2015**.
- (33) López Tévez, L. Estudio de Complejos Metálicos Con Ligandos de Interés Biológico., Universidad Nacional de la Plata, 2016.
- (34) Romero Estévez, D.; Yáñez Jácome, G. S.; Simbaña Farinango, K.; Navarrete, H. Content and the Relationship between Cadmium, Nickel, and Lead Concentrations in Ecuadorian Cocoa Beans from Nine Provinces. *Food Control* **2019**, *106* (May), 106750. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106750>.
- (35) World Health Organization. Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern. *Prev. Dis. Through Heal. Environ.* **2010**, 3–6.
- (36) Geng, H. X.; Wang, L. Cadmium: Toxic Effects on Placental and Embryonic Development. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2019**, *67* (August 2018), 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.02.006>.
- (37) Moreno Mariño, Y. L.; García Colmenares, J. M.; Chaparro Acuña, S. P. Cuantificación Voltamétrica de Plomo y Cadmio En Papa Fresca. *Rev. U.D.C.A Actual. Divulg. Científica* **2016**, *19* (1), 97–104. <https://doi.org/10.31910/rudca.v19.n1.2016.114>.
- (38) Mendoza, B.; Almaso, L.; Marcó Parra, L. M.; Rodríguez, V. Evaluación de Dos Métodos de Digestión Ácida En El Análisis de Tejido Foliar de Caña (Saccharum Officinarum L.). *Cienc. y Tecnol.* **2015**, *7* (2), 9–20. <https://doi.org/10.18779/cyt.v7i2.98>.
- (39) Condezo Nuñez, S.; Huaraca Mezones, C. V. Cuantificación de Plomo, Cadmio y Arsénico En Granos de Cacao Theobroma Cacao L. t Café Coffea L. de La Zona de Jaen Cajamarca Durante El Periodo Febrero - Julio 2018., Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica, 2018.
- (40) Allen, H.; Hill, O. Electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* **2013**, *59* (6), 743–748. <https://doi.org/10.1351/pac198759060743>.
- (41) Brett, C. Electrode Reactions. *Electrochem. Met. Semicond. Electrodes* **2014**, 213–233. <https://doi.org/10.1016/b978-044482806-4/50007-6>.
- (42) García González, C. A.; Tene Japón, A.; Burgos Dias, K.; Zambrano, C. Técnicas

- y Métodos Electroquímicos: Galvanoplastia y Potenciometría. *Alternativas* **2019**, 19 (1). <https://doi.org/10.23878/alternativas.v19i1.196>.
- (43) Hulanicki, A.; Maj Żurawska, M.; Glab, S. Titrimetry | Potentiometry. *Encycl. Anal. Sci.* **2013**, No. March, 121–128. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.00546-1>.
- (44) Dias, L. G.; Meirinho, S. G.; Veloso, A. C. A.; Rodrigues, L. R.; Peres, A. M. *Electronic Tongues and Aptasensors*; Elsevier Ltd., 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100741-9.00013-9>.
- (45) Roy, S.; Pandit, S. *Microbial Electrochemical System*; Elsevier B.V., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64052-9.00002-9>.
- (46) Guy, O. J.; Walker, K. A. D. *Graphene Functionalization for Biosensor Applications*, Second Edi.; Elsevier Inc., 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802993-0.00004-6>.
- (47) Honeychurch, K. C. Printed Thick-Film Biosensors. *Print. Film. Mater. Sci. Appl. Sensors, Electron. Photonics* **2012**, 366–409. <https://doi.org/10.1533/9780857096210.2.366>.
- (48) Rezaei, B.; Irannejad, N. *Electrochemical Detection Techniques in Biosensor Applications*; Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816491-4.00002-4>.
- (49) Bansod, B. K.; Kumar, T.; Thakur, R.; Rana, S.; Singh, I. A Review on Various Electrochemical Techniques for Heavy Metal Ions Detection with Different Sensing Platforms. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 94 (January), 443–455. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.031>.
- (50) Mhammedi, M. A. El; Achak, M.; Bakasse, M. Square Wave Voltammetry for Analytical Determination of Cadmium in Natural Water Using Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂-Modified Platinum Electrode. *Am. J. Anal. Chem.* **2010**, 01 (03), 150–158. <https://doi.org/10.4236/ajac.2010.13019>.
- (51) Alves Ferreira, M. A. Técnicas Electroquímicas Para La Determinación y Especiación de Arsénico En Aguas. In *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de As en aguas.*; Litter, Armienta, F., Ed.; 2009; p 26.
- (52) Huertas Orgoza, S. J. Determinación de Las Cantidades de Plomo (II) Presente En Fresas Frescas Provenientes de La Vereda La Unión En El Municipio de Sibaté En Cundinamarca - Colombia, Por Medio de Voltametría de Onda Cuadrada (SWV)., Universidad Santo Tomás, 2018, Vol. 16.
- (53) El Mhammedi, M. A.; Achak, M.; Bakasse, M. Evaluation of a platinum electrode modified with hydroxyapatite in the lead(ii) determination in a square wave voltammetric procedure. *Arab. J. Chem.* **2013**, 6 (3), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.10.010>.
- (54) Grimshaw, J. Capítulo 1 - Electrochemical oxidation and reduction of organic compounds. In *Electrochemical Reactions and Mechanisms in Organic Chemistry*; 2000; pp 1–26.
- (55) Nnamchi, P. S.; Obayi, C. S. Electrochemical characterization of nanomaterials;

Elsevier Ltd., 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101973-3.00004-3>.

- (56) Tafur Salazar, L. Determinación de metales pesados cd (II), pb (II) y hg (II) mediante voltametría de redisolución anódica, en aguas residuales mineras (Distrito Minero Portovelo). *Esc. Politécnica Nac. Quito* **2016**, No. II, 111.
- (57) MetAs & Asociados Metrólogos. Linealidad. *La Guía Metas* **2008**, 1–14.
- (58) Quino, I.; Ramos, O.; Guisbert, E. Determinación del límite de detección instrumental (ldi) y límite de cuantificación instrumental (lci) en elementos traza de agua subterránea. *Rev. Boliv. Química* **2007**, 24 (1), 53–57.
- (59) McMillan, J. E. Principles of analytical validation; Elsevier B.V., 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59378-8.00011-6>.
- (60) Acosta, S.; Pozo, P. Determinación de cadmio en la almendra de cacao (theobroma cacao) de cinco fincas ubicadas en la vía Santo Domingo - Esmeraldas, mediante espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito. *infoANALÍTICA* **2013**, 1 (1), 69–82.

ANEXOS



*Anexo 1: Río Santa Rosa de la Provincia de EL Oro y presencia de contaminación minera.
Fuente: Elaboración propia.*



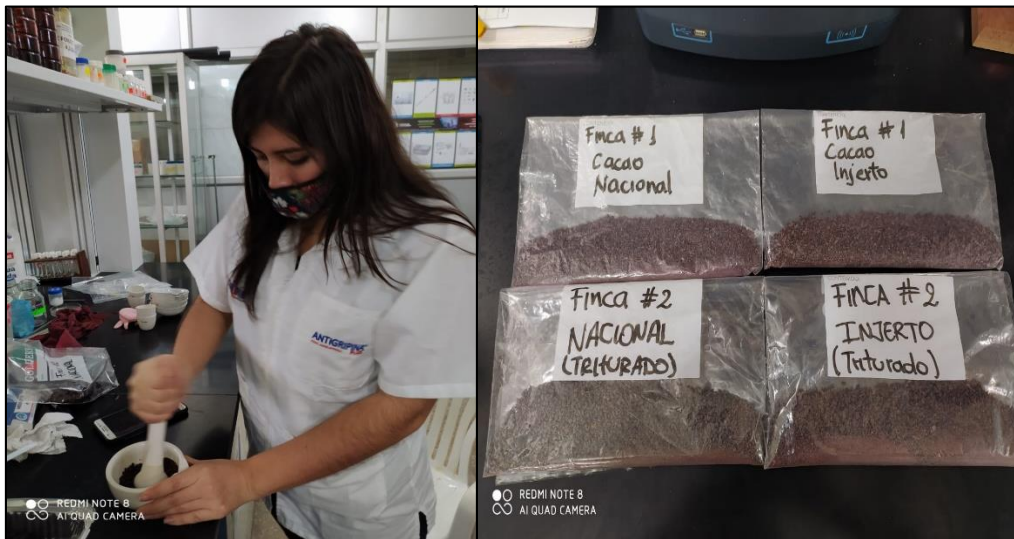
*Anexo 2: Recolección aleatoria de mazorca de cacao
Fuente: Elaboración propia..*



*Anexo 3: Cacao nacional e injerto.
Fuente: Elaboración propia.*



Anexo 4: Secado y descascarado de la almendra de cacao.
Fuente: Elaboración propia.



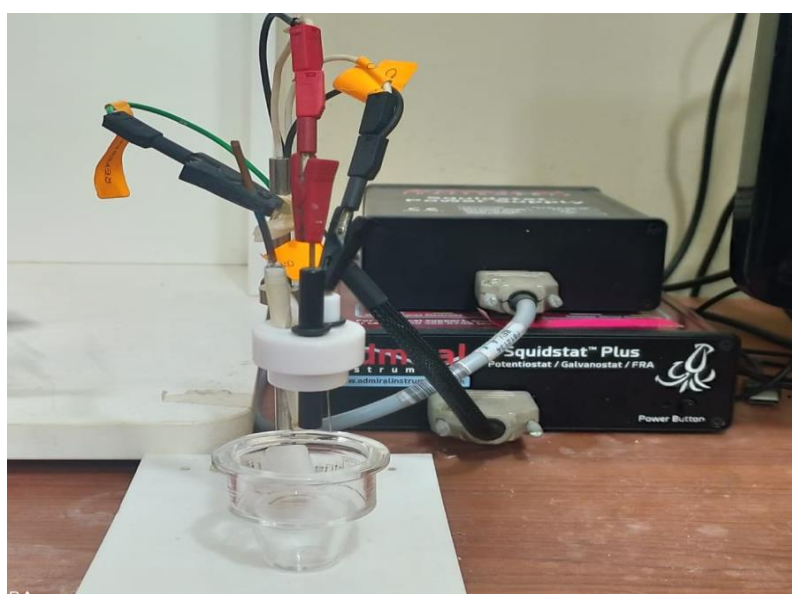
Anexo 5: Triturado y etiquetado de muestras representativas de cacao.
Fuente: Elaboración propia.



Anexo 6: Calcinación de muestras de cacao.
Fuente: Elaboración propia.



Anexo 7: Digestión ácida de cenizas de cacao
Fuente: Elaboración propia.



Anexo 8: Potenciostato/Galvanostato constituido por: electrodo de trabajo de oro, alambre de platino como contra electrodo y electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia.
Fuente: Elaboración propia.