



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN EL FORRAJE  
CONSUMIDO POR EL GANADO VACUNO DE LA PARROQUIA  
BILBAO Y EVALUACIÓN DE SU INCIDENCIA EN LA CADENA  
ALIMENTARIA”**

**Trabajo de Titulación**

Tipo: Proyecto de Investigación.

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORAS:** TERESA ELIZABETH ALBÁN GUERRERO

SAYURI FERNANDA RUIZ ILLAPA

**DIRECTORA:** Dra. IRENE DEL CARMEN GAVILANES TERÁN PhD.

Riobamba – Ecuador

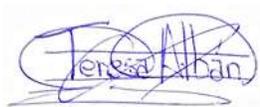
2021

© 2021, Teresa Elizabeth Albán Guerrero & Sayuri Fernanda Ruiz Illapa

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Nosotras, Teresa Elizabeth Albán Guerrero y Sayuri Fernanda Ruiz Illapa, declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados. Como autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 13 de septiembre de 2021.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Teresa Albán', enclosed within a circular scribble.

**Teresa Elizabeth Albán Guerrero**  
**060432708-0**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Sayuri Ruiz', written in a cursive style.

**Sayuri Fernanda Ruiz Illapa**  
**060502039-5**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Proyecto de Investigación, “**DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN EL FORRAJE CONSUMIDO POR EL GANADO VACUNO DE LA PARROQUIA BILBAO Y EVALUACIÓN DE SU INCIDENCIA EN LA CADENA ALIMENTARIA**”, realizado por las señoritas: **TERESA ELIZABETH ALBÁN GUERRERO y SAYURI FERNANDA RUIZ ILLAPA** ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Dra. Lourdes Cumandá Carrera Beltrán Mg. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>	 Firmado electrónicamente por: <b>LOURDES CUMANDA CARRERA BELTRAN</b>	2021-09-13
Dra. Irene del Carmen Gavilanes Terán PhD. <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>	 Firmado electrónicamente por: <b>IRENE DEL CARMEN GAVILANES TERAN</b>	2021-09-13
Dr. Julio Cesar Idrovo Novillo PhD. <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	 Firmado electrónicamente por: <b>JULIO CESAR IDROVO NOVILLO</b>	2021-09-13

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico primeramente a Dios, quien ha sido el que me ha levantado y me ha llenado de fuerzas para continuar y me guio durante todo el camino hacia una de las metas que estoy cumpliendo ahora mismo, se lo dedico con todo cariño a mis padres quienes han sido los embajadores de mi presente y futuro y que gracias a su amor, trabajo y sacrificio me han ayudado a cumplir un sueño más, quienes han forjado mi carácter y me inculcaron valores ayudándome a ser una mejor persona guiándome por las riendas de mi bienestar.

Teresa Albán

A Dios por fortalecer mi corazón, iluminar mi mente y haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante esta etapa estudiantil, a mis padres por llenar mi vida de amor y valiosos consejos, a mis hermanas por alegrar mis días y ser mis mejores amigas, y en general a toda mi familia por siempre creer en mí.

Sayuri Ruiz

## **AGRADECIMIENTO**

Ante todo, quiero agradecer a Dios que me ha dado alivio y bienestar en mi vida y me ha llevado de la mano, en segundo lugar, quiero agradecer a mis Padres por la confianza entregada en cada una de mis decisiones y hacerme sentir segura teniéndolos a mi lado en cada paso que he dado. También quiero agradecer a mis profesores de la Facultad de Ciencias con quienes he tratado y me han impartido sus conocimientos en clase siendo fundamentales en mi vida estudiantil, gracias por darme bases sólidas con conocimientos que me han sido necesarios para realizar este trabajo y me servirán en mi vida profesional. Y mi más sincero agradecimiento a la Dra. Irene Gavilanes y al grupo GAIBAQ por abrirme las puertas en su grupo de investigación y poner su confianza en mí y permitirme realizar la investigación con su guía.

Teresa Albán

Doy gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de existir, soñar y hoy culminar mi meta más grande. A mis padres por su infinito amor y apoyo incondicional, a mis hermanas por ser mi fortaleza en esta etapa universitaria, con su cariño me hacen sentir una persona especial. A los docentes y técnicos docentes de la Facultad de Ciencias por compartir sus conocimientos de manera profesional e invaluable. A mi tutora Dra. Irene Gavilanes PhD que con su amplia experiencia y formación me guio en este trabajo de investigación, y al grupo GAIBAQ por permitirme formar parte su grupo y orientarme durante todo este tiempo que permanecí en el laboratorio. A todos ustedes gracias.

Sayuri Ruiz

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xviii
SUMMARY .....	xix
INTRODUCCIÓN .....	1

## CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Contaminación del suelo.....	5
1.2. Fuentes de los contaminantes del suelo .....	5
1.2.1. <i>Fuentes antropogénicas</i> .....	5
1.2.2. <i>Fuentes geogénicas naturales</i> .....	6
1.2.3. <i>Actividad del volcán Tungurahua</i> .....	6
1.2.3.1. <i>Composición química de la ceniza</i> .....	7
1.3. Metales pesados como contaminantes de suelo.....	7
1.3.1. <i>Plomo</i> .....	8
1.3.2. <i>Cadmio</i> .....	8
1.3.3. <i>Mercurio</i> .....	9
1.3.4. <i>Arsénico</i> .....	9
1.3.5. <i>Selenio</i> .....	9
1.4. Disponibilidad de metales pesados en el suelo .....	9
1.4.1. <i>Factores que influyen en la disponibilidad de metales pesados</i> .....	10
1.4.1.1. <i>Proceso de Adsorción</i> .....	10
1.4.1.2. <i>Complejo arcilloso-húmico</i> .....	11
1.4.1.3. <i>Textura del suelo</i> .....	11
1.4.1.4. <i>Materia Orgánica</i> .....	12
1.4.1.5. <i>Capacidad de intercambio catiónico (CIC)</i> .....	12
1.4.1.6. <i>Potencial de hidrógeno</i> .....	13

1.4.1.7.	<i>Conductividad eléctrica</i> .....	13
1.4.1.8.	<i>Densidad</i> .....	13
1.5.	<b>El suelo como fuente de nutrientes minerales</b> .....	14
1.5.1.	<i>Absorción de iones</i> .....	15
1.6.	<b>Impactos de la contaminación del suelo en la cadena alimentaria</b> .....	15
1.6.1.	<i>Contaminación del suelo, absorción por las plantas y contaminación de la cadena alimentaria</i> .....	16
1.6.2.	<i>Factores BCF, TF y BTF</i> .....	17
1.6.2.1.	<i>Factor de bioconcentración (BCF)</i> .....	17
1.6.2.2.	<i>Factor de traslocación (TF)</i> .....	17
1.6.2.3.	<i>Factor de biotransferencia (BTF)</i> .....	18
1.6.3.	<i>Riesgos para la salud humana asociados a la contaminación de alimentos con metales pesados</i> .....	18
1.6.3.1.	<i>Cadmio</i> .....	18
1.6.3.2.	<i>Plomo</i> .....	18
1.6.3.3.	<i>Mercurio</i> .....	19
1.6.3.4.	<i>Arsénico</i> .....	19
1.6.3.5.	<i>Selenio</i> .....	19
1.7.	<b>Parámetros de evaluación de riesgos para la salud</b> .....	19
1.7.1.	<i>Cociente de peligro objetivo</i> .....	19
1.7.2.	<i>Índice de peligro</i> .....	20
1.7.3.	<i>Ingesta diaria estimada</i> .....	20
1.8.	<b>Leche</b> .....	21
1.8.1.	<i>Composición</i> .....	21
1.8.1.1.	<i>Lactosa</i> .....	22
1.8.1.2.	<i>Grasa</i> .....	22
1.8.1.3.	<i>Proteínas</i> .....	23
1.8.1.4.	<i>Sales</i> .....	24
1.8.2.	<i>Mecanismos de fijación de MP</i> .....	24
1.8.3.	<i>Excreción de MP</i> .....	25
1.9.	<b>Límites máximos permisibles de metales pesados en alimentos</b> .....	25

## CAPÍTULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.</b>	<b>Materiales, equipos y reactivos .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.1.</b>	<b><i>Materiales</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.2.</b>	<b><i>Equipos</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.3.</b>	<b><i>Reactivos</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.</b>	<b>Técnicas y Métodos .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.1.</b>	<b><i>Levantamiento de la información mediante encuestas</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.1.1.</b>	<b><i>Metodología de encuestas</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.1.2.</b>	<b><i>Análisis y organización de datos</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2.</b>	<b><i>Diseño experimental de muestreo</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.3.</b>	<b><i>Localización del lugar de estudio</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.4.</b>	<b><i>Método de muestreo</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.5.</b>	<b><i>Preparación de las muestras</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.6.</b>	<b><i>Análisis físico químico del suelo</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.6.1.</b>	<b><i>Determinación de la densidad real</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.6.2.</b>	<b><i>Determinación de la densidad aparente</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.6.3.</b>	<b><i>Determinación de la textura</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.6.4.</b>	<b><i>Determinación del pH</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2.6.5.</b>	<b><i>Determinación de la conductividad eléctrica (CE)</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2.6.6.</b>	<b><i>Determinación de materia orgánica</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>2.2.7.</b>	<b><i>Análisis de macronutrientes en suelo</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>2.2.7.1.</b>	<b><i>Digestión de muestras de suelo para la medición fósforo (P) y potasio (K)</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>2.2.7.2.</b>	<b><i>Determinación de Fósforo (P)</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>2.2.7.3.</b>	<b><i>Determinación de Potasio (K)</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>2.2.7.4.</b>	<b><i>Determinación de Carbono y Nitrógeno</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>2.2.8.</b>	<b><i>Digestión ácida por el método de calcinación por vía húmeda para la determinación de metales pesados en suelo</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>2.2.9.</b>	<b><i>Análisis fisicoquímico de muestras vegetales</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.9.1.</b>	<b><i>Determinación de pH</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.9.2.</b>	<b><i>Determinación de conductividad eléctrica</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.9.3.</b>	<b><i>Determinación de materia orgánica (MO)</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>2.2.10.</b>	<b><i>Análisis de nutrientes de muestras vegetales</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>2.2.10.1.</b>	<b><i>Determinación de aniones</i>.....</b>	<b>47</b>

2.2.10.2.	<i>Digestión de muestras vegetales para la medición de Na, K y P</i> .....	50
2.2.10.3.	<i>Determinación de Sodio (Na) en forraje</i> .....	51
2.2.10.4.	<i>Determinación de Potasio (K) en forraje</i> .....	52
2.2.10.5.	<i>Determinación de Fósforo (P) en forraje</i> .....	52
2.2.11.	<i>Digestión de muestras vegetales para la determinación de metales pesados</i> .....	53
2.2.12.	<i>Análisis fisicoquímico de la leche</i> .....	54
2.2.12.1.	<i>Análisis en el equipo Lactoscan</i> .....	54
2.2.12.2.	<i>Determinación de acidez titulable como ácido láctico</i> .....	55
2.2.12.3.	<i>Determinación de cenizas</i> .....	56
2.2.12.4.	<i>Ensayo de reductasa</i> .....	57
2.2.13.	<i>Análisis cualitativo de la leche</i> .....	58
2.2.13.1.	<i>Determinación de la estabilidad proteica</i> .....	58
2.2.13.2.	<i>Presencia de conservantes</i> .....	58
2.2.13.3.	<i>Presencia de neutralizantes</i> .....	60
2.2.13.4.	<i>Presencia de adulterantes</i> .....	61
2.2.14.	<i>Digestión de muestras de leche para determinación de metales pesados</i> .....	61
2.2.15.	<i>Determinación de metales pesados por Espectroscopia de Absorción Atómica de llama</i> .....	62
2.2.15.1.	<i>Determinación de Plomo y Cadmio</i> .....	62
2.2.15.2.	<i>Determinación de Mercurio</i> .....	63
2.2.15.3.	<i>Determinación de Arsénico</i> .....	64
2.2.15.4.	<i>Determinación de Selenio</i> .....	64
2.2.16.	<i>Factores de bioconcentración, translocación y biotransferencia</i> .....	65
2.2.17.	<i>Evaluación de los parámetros de riesgo para la salud</i> .....	65

### CAPÍTULO III

3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	67
3.1.	<b>Análisis de encuestas</b> .....	67
3.1.1.	<i>Sección 1: Datos Personales</i> .....	67
3.1.2.	<i>Sección 2: Desarrollo</i> .....	68
3.2.	<b>Resultado del diseño experimental de muestreo</b> .....	79
3.3.	<b>Resultados de los análisis fisicoquímicos del suelo</b> .....	80

3.3.1.	<i>Densidad real</i> .....	80
3.3.2.	<i>Densidad aparente</i> .....	81
3.3.3.	<i>pH</i> .....	82
3.3.4.	<i>Conductividad eléctrica</i> .....	82
3.3.5.	<i>Materia orgánica</i> .....	83
3.3.6.	<i>Textura</i> .....	83
3.4.	<b>Resultados del análisis de macronutrientes y metales pesados en el suelo</b> .....	84
3.4.1.	<i>Potasio y Fósforo</i> .....	85
3.4.2.	<i>Carbono y Nitrógeno</i> .....	86
3.5.	<b>Resultados de Metales Pesados en suelo</b> .....	86
3.6.	<b>Resultados de Metales Pesados en la raíz</b> .....	87
3.7.	<b>Resultados de los análisis fisicoquímicos de forraje</b> .....	88
3.7.1.	<i>pH</i> .....	89
3.7.2.	<i>Conductividad eléctrica</i> .....	89
3.7.3.	<i>Materia orgánica</i> .....	89
3.8.	<b>Resultados de metales pesados, macro y micronutrientes en el forraje</b> .....	90
3.8.1.	<i>Fosfatos</i> .....	92
3.8.2.	<i>Nitratos</i> .....	92
3.8.3.	<i>Sulfatos</i> .....	92
3.8.4.	<i>Cloruros</i> .....	93
3.8.5.	<i>Potasio, Fósforo y Sodio</i> .....	93
3.8.6.	<i>Carbono y Nitrógeno</i> .....	94
3.8.7.	<i>Resultados de Metales Pesados en forraje</i> .....	95
3.9.	<b>Resultados del análisis fisicoquímico de la leche</b> .....	95
3.9.1.	<i>Densidad relativa</i> .....	97
3.9.2.	<i>Materia grasa</i> .....	97
3.9.3.	<i>Acidez titulable</i> .....	98
3.9.4.	<i>Sólidos totales</i> .....	98
3.9.5.	<i>Sólidos no grasos</i> .....	98
3.9.6.	<i>Cenizas</i> .....	99
3.9.7.	<i>Punto de congelación</i> .....	99
3.9.8.	<i>Proteínas</i> .....	99
3.9.9.	<i>Ensayo de reductasa</i> .....	100

3.9.10.	<i>Lactosa</i> .....	100
3.9.11.	<i>Adición de agua</i> .....	100
3.9.12.	<i>pH</i> .....	101
3.9.13.	<i>Sales</i> .....	101
3.9.14.	<i>Conductividad eléctrica</i> .....	101
3.10.	<b>Resultados de análisis cualitativos de la calidad de la leche</b> .....	102
3.10.1.	<i>Estabilidad proteica</i> .....	103
3.10.2.	<i>Presencia de conservantes</i> .....	103
3.10.3.	<i>Presencia de neutralizantes</i> .....	103
3.10.4.	<i>Presencia de adulterantes</i> .....	103
3.11.	<b>Resultados de Metales pesados en la leche</b> .....	104
3.12.	<b>Resultados de los Factores de Bioconcentración, Translocación y Biotransferencia</b> .....	105
3.12.1.	<i>Factor de bioconcentración (BCF)</i> .....	106
3.12.1.1.	<i>Plomo</i> .....	106
3.12.1.2.	<i>Cadmio</i> .....	106
3.12.1.3.	<i>Mercurio</i> .....	106
3.12.1.4.	<i>Arsénico</i> .....	107
3.12.1.5.	<i>Selenio</i> .....	107
3.12.2.	<i>Factor de translocación (TF)</i> .....	107
3.12.2.1.	<i>Plomo</i> .....	107
3.12.2.2.	<i>Cadmio</i> .....	107
3.12.2.3.	<i>Mercurio</i> .....	107
3.12.2.4.	<i>Arsénico</i> .....	108
3.12.2.5.	<i>Selenio</i> .....	108
3.12.3.	<i>Factor de biotransferencia (BTF)</i> .....	108
3.13.	<b>Resultados de la evaluación de riesgos para la salud</b> .....	108
3.14.	<b>Socialización de resultados</b> .....	109
<b>CONCLUSIONES</b> .....		110
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		112
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Macro y micronutrientes del suelo, MP que pueden ser esenciales .....	8
<b>Tabla 2-1:</b> Metales clasificados en grupos según su potencial de riesgo para la cadena alimentaria a través de la absorción por las plantas .....	16
<b>Tabla 3-1:</b> Composición de la leche de ganado vacuno .....	22
<b>Tabla 1-2:</b> Datos de consumo de leche .....	66
<b>Tabla 1-3:</b> Identificación de los puntos de muestreo de la parroquia Bilbao .....	79
<b>Tabla 2-3:</b> Resultados del análisis fisicoquímico de las muestras de suelo .....	80
<b>Tabla 3-3:</b> Resultados de macronutrientes y metales pesados en suelo .....	84
<b>Tabla 4-3:</b> Resultados de metales pesados en las muestras de raíz .....	87
<b>Tabla 5-3:</b> Resultados de los análisis fisicoquímicos de muestras de forraje .....	88
<b>Tabla 6-3:</b> Resultados de macro y micronutrientes en el forraje .....	91
<b>Tabla 7-3:</b> Resultados de metales pesados en el forraje .....	91
<b>Tabla 8-3:</b> Análisis fisicoquímicos de la leche cruda .....	96
<b>Tabla 9-3:</b> Resultados de los ensayos cualitativos para la determinación de la calidad de la leche. ....	102
<b>Tabla 10-3:</b> Resultados de metales pesados en la leche .....	104
<b>Tabla 11-3:</b> Resultados de los factores de bioconcentración, translocación, y biotransferencia. ..	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1.</b> Capacidad de intercambio catiónico.....	13
<b>Figura 1-2.</b> Encuestas realizadas a moradores de la parroquia Bilbao.....	29
<b>Figura 2-2.</b> Mapa geográfico del cantón Penipe y ubicación de la parroquia Bilbao. ....	31
<b>Figura 3-2.</b> Mapa Geográfico de los sitios de muestreo de suelo, forraje y leche de la Parroquia Bilbao, Penipe.....	32
<b>Figura 4-2.</b> Localización de los sitios de muestreo de suelo, forraje y leche de la Parroquia Bilbao, Penipe.....	32
<b>Figura 5-2.</b> Delimitación del área de muestreo, recolección de las muestras y determinación de temperatura y humedad con el termohigrómetro. ....	33
<b>Figura 6-2.</b> Secado de muestras de suelo a temperatura ambiente.....	34
<b>Figura 7-2.</b> Toma de muestra de leche y almacenamiento en un cooler. ....	35
<b>Figura 8-2.</b> Toma de muestra de forraje, lavado y almacenamiento en fundas ziploc. ....	35
<b>Figura 9-2.</b> Secado de muestras vegetales y almacenamiento en frascos estériles en el desecador. ....	36
<b>Figura 10-2.</b> Tamizado de las muestras secas de suelo. ....	36
<b>Figura 11-2.</b> Determinación de densidad real. ....	37
<b>Figura 12-2.</b> Determinación de densidad aparente.....	38
<b>Figura 13-2.</b> Triángulo de textura del USDA.....	39
<b>Figura 14-2.</b> Determinación de textura .....	39
<b>Figura 15-2.</b> Medición de pH y CE en suelos .....	40
<b>Figura 16-2.</b> Determinación de materia orgánica.....	41
<b>Figura 17-2.</b> Digestión de suelos con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	42
<b>Figura 18-2.</b> Determinación de Macronutrientes .....	44
<b>Figura 19-2.</b> Digestión de muestras de suelo .....	44
<b>Figura 20-2.</b> Almacenamiento de las muestras de suelo digestadas .....	45
<b>Figura 21-2.</b> Determinación de pH y CE en muestras de forraje .....	46
<b>Figura 22-2.</b> Determinación de MO en muestras de forraje.....	47
<b>Figura 23-2.</b> Preparación de muestras vegetales para la determinación de aniones.....	48
<b>Figura 24-2.</b> Medición de aniones en el espectrofotómetro visible HACH DR 2800 .....	49
<b>Figura 25-2.</b> Medición de cloruros por el método argentométrico .....	50
<b>Figura 26-2.</b> Digestión de muestras de forraje.....	51
<b>Figura 27-2.</b> Medición de Na y K en el fotómetro de llama .....	52

<b>Figura 28-2.</b> Medición de P en el espectrofotómetro UV-VIS .....	53
<b>Figura 29-2.</b> Digestión de muestras vegetales.....	54
<b>Figura 30-2.</b> Análisis en el equipo Lactoscan. ....	55
<b>Figura 31-2.</b> Determinación de acidez titulable. ....	56
<b>Figura 32-2.</b> Determinación de cenizas.....	57
<b>Figura 33-2.</b> Ensayo de reductasa. ....	57
<b>Figura 34-2.</b> Determinación de la estabilidad proteica. ....	58
<b>Figura 35-2.</b> Identificación de formaldehído. ....	58
<b>Figura 36-2.</b> Identificación de peróxido de hidrógeno.....	59
<b>Figura 37-2.</b> Identificación de cloro, hipocloritos, cloraminas y dióxido de cloro. ....	59
<b>Figura 38-2.</b> Prueba de alizarina. ....	60
<b>Figura 39-2.</b> Identificación de orina en leche.....	60
<b>Figura 40-2.</b> Detección de almidón.....	61
<b>Figura 41-2.</b> Digestión de muestras de leche. ....	62
<b>Figura 42-2.</b> Determinación de metales pesados por Espectroscopia de Absorción Atómica. ....	62
<b>Figura. 1-3.</b> Socialización de resultados.....	109

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A:** ENCUESTA DE PLAN DE MUESTREO DE LA PARROQUIA BILBAO

**ANEXO B:** LEVANTAMIENTO DE LA INFORMACIÓN MEDIANTE ENCUESTAS

**ANEXO C:** RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO, FORRAJE Y LECHE

**ANEXO D:** PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SUELO Y FORRAJE EN EL  
LABORATORIO

**ANEXO E:** ANÁLISIS DE SUELO

**ANEXO F:** ANÁLISIS DE FORRAJE

**ANEXO G:** ANÁLISIS DE LECHE

**ANEXO H:** CERTIFICADOS DE CALIDAD DE LOS ESTÁNDARES DE METALES  
PESADOS

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Adición de agua
<b>AT</b>	Acidez titulable
<b>BCF</b>	Factor de bioconcentración
<b>BTF</b>	Factor de biotransferencia
<b>C</b>	Carbono
<b>Cd</b>	Cadmio
<b>Ce</b>	Cenizas
<b>CE</b>	Conductividad eléctrica
<b>Da</b>	Densidad aparente
<b>Dr</b>	Densidad Relativa
<b>EDI</b>	Ingesta diaria estimada
<b>F</b>	Muestra de forraje
<b>Hg</b>	Mercurio
<b>HI</b>	Índice de peligro
<b>K</b>	Potasio
<b>L</b>	Muestra de leche
<b>La</b>	Lactosa
<b>MG</b>	Materia Grasa
<b>MO</b>	Materia orgánica
<b>MP</b>	Metales pesados
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>Na</b>	Sodio
<b>NTE</b>	Normativa técnica ecuatoriana
<b>P</b>	Fósforo
<b>Pb</b>	Plomo
<b>PC</b>	Punto de congelación
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PR</b>	Proteínas

<b>R</b>	Muestra de raíz
<b>Re</b>	Reductasa
<b>S</b>	Muestra de suelo
<b>Sa</b>	Sales
<b>Se</b>	Selenio
<b>SNG</b>	Sólidos no grasos
<b>ST</b>	Sólidos Totales
<b>TF</b>	Factor de translocación
<b>THQ</b>	Coefficiente de peligro objetivo
<b>TRAM</b>	Tiempo de reducción del azul de metileno

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la concentración de metales pesados (MP) en el forraje consumido por el ganado vacuno de la parroquia Bilbao, provincia de Tungurahua; y evaluar su incidencia en la cadena alimentaria, para lo cual se cuantificó concentraciones de plomo, cadmio, mercurio, arsénico y selenio en muestras de suelo, forraje y leche mediante el método de espectroscopia de absorción atómica con llama y generador de hidruros. El tipo muestreo empleado fue probabilístico aleatorio simple y se lo realizó en siete puntos que abarcaron toda la zona ganadera productora de leche de Bilbao. Los parámetros analizados para evaluar la capacidad adsorptiva del suelo fueron pH, conductividad eléctrica, densidad real, aparente, textura y materia orgánica, además se cuantificó los niveles de macronutrientes primarios en el suelo y forraje, en este último también se determinó sodio y aniones. A nivel de la raíz se determinó MP, en la leche se realizó un análisis fisicoquímico y de calidad, por último, con las concentraciones de MP se evaluaron factores de transferencia y riesgos para la salud. Los resultados obtenidos fueron ingresados en el software SPSS donde se realizó el análisis de varianza ANOVA y la prueba de TUKEY-B. Las concentraciones de los cinco metales en las muestras de suelo se encuentran por debajo del límite establecido en la normativa, en las muestras forraje, raíz y leche las concentraciones están por debajo del límite de detección del método aplicado, sin embargo, las concentraciones obtenidas de arsénico y selenio en forraje y raíz están por debajo del límite permisible. Se concluye que las tres matrices analizadas no presentan contaminación por metales pesados, por ende, no generan riesgos en la salud, además de que la capacidad adsorptiva del suelo es aceptable. Se recomienda realizar la cuantificación de metales pesados con métodos más sensibles.

**Palabras clave:** <METALES PESADOS>, <VOLCÁN TUNGURAHUA>, <CENIZA>, <SUELO>, <FORRAJE>, <LECHE>, <BILBAO (PARROQUIA)>.

LEONARDO  
FABIO  
MEDINA  
NUSTE

Firmado digitalmente  
por LEONARDO  
FABIO MEDINA  
NUSTE  
Fecha: 2021.09.27  
10:50:34 -05'00'



1828-DBRA-UTP-2021

## SUMMARY

The purpose of this research was to determine the concentration of heavy metals (HM) in the forage consumed by the cattle of the Bilbao parish, province of Tungurahua to evaluate its impact on the food chain. In which was quantified the concentrations of lead, cadmium, mercury, arsenic, and selenium in soil samples, forage, and milk, by the method of atomic absorption spectroscopy with flame and generator of hydrides. The type of sampling used was simple random probability and was carried out in seven points that covered the entire dairy farming area of Bilbao. Parameters analyzed to evaluate the adsorptive capacity of the soil were pH, electrical conductivity, real, apparent density, texture, and organic matter. In addition, the levels of primary macronutrients in the soil and forage, in which sodium and anions were also found. HM were determined at the root level, a physicochemical analysis was performed on the quality of milk, finally, the concentrations of HM, and transfer factors were evaluated for health risks factors. The results obtained were entered into the SPSS software where an ANOVA analysis of variance and TUKEY-B test were also performed. Concentrations of the five metals in the soil samples are below the limit established in the regulations, in the forage, root, and milk samples the concentrations are below the detection limit from the applied method, however, the concentrations obtained from arsenic and selenium in forage and root are below the permissible limit. It is concluded that the three matrices analyzed do not present contamination by heavy metals. Therefore, these do not generate health risks, in addition to the fact that the adsorptive capacity of the soil is acceptable. It's highly recommended to carry out the quantification of heavy metals with more sensitive methods.

**Keywords:** <HEAVY METALS> <TUNGURAHUA VOLCANO> <VOLCANIC ASH> <FLOOR> <FORAGE> <MILK> <BILBAO (PARISH)>.

## INTRODUCCIÓN

Bilbao es una parroquia que se encuentra localizada en el catón Penipe de la provincia de Chimborazo, geográficamente está ubicada en las faldas del volcán Tungurahua, flanco norte. Desde el año 1999 hasta el año 2016 el volcán Tungurahua registró constantes procesos eruptivos caracterizados por explosiones estrambolianas, flujos piroclásticos, actividad hidrotermal, así como emisiones subcontinuas de gas y ceniza (Instituto Geofísico, 2015), que cambió la forma de vida de los habitantes al afectar la actividad agrícola y ganadera, esta última por la disminución en el rendimiento de los pastizales empleados en la alimentación del ganado (GADM Penipe, 2016).

En las regiones volcánicas, los materiales piroclásticos y la ceniza forman suelos con propiedades físicas, químicas y mineralógicas únicas, convirtiéndose en una fuente de almacenamiento y circulación de varios tipos de contaminantes como los metales pesados (Ma et al., 2019: pp.1-2). Los metales pesados (MP) se caracterizan porque a concentraciones muy bajas pueden provocar toxicidad, misma que está dada por la alta afinidad hacia los tejidos de los organismos vivos, ya que no están sujetos a degradación metabólica. Metales como el arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb), mercurio (Hg), selenio (Se), níquel (Ni), cobalto (Co) y cobre (Cu) son relativamente tóxicos para plantas y animales superiores debido a su alta movilidad y poder de acumulación (Rodríguez et al., 2019: pp.24).

Cuando estos elementos se incorporan al suelo y superan ciertos umbrales de concentración provocan contaminación haciendo que los cultivos producidos sean inseguros para el consumo animal y humano. La presencia de metales pesados en los alimentos y en particular en los productos lácteos involucra la contaminación del suelo y forraje; en primera instancia los metales pesados quedan retenidos en las partículas del suelo, posteriormente son absorbidos por las raíces, se transportan y acumulan en la parte área del vegetal y finalmente son biotransformados por el ganado vacuno durante el pastoreo (McBride, 1994; citado en Rodríguez et al., 2019).

El 90% de la ingesta de elementos traza se produce por el consumo de alimentos contaminados; lo que implica un riesgo para la salud. En el organismo humano los MP presentan una gran afinidad por el grupo sulfhidrilo inactivando aproximadamente 200 enzimas necesarias para diversos procesos biológicos, una exposición prolongada puede generar problemas de hepatotoxicidad y neurotoxicidad (Goetschel, 2018, p.13).

A nivel internacional países como China, el Alto Egipto, Francia, México y Colombia han realizados varios estudios sobre los MP en diferentes matrices. El estudio denominado “Heavy metals and trace elements levels in milk and milk products”, determinó las concentraciones de Pb, Cd, Zn, Cu y Fe en leche y en productos lácteos del Alto Egipto y evaluó los riesgos potenciales

para la salud a través del consumo de estos alimentos (Arafa et al., 2014: p.13). Otro estudio denominado “Metales pesados en leche de vacas alimentadas con alfalfa producida en suelos irrigados con aguas residuales en Puebla y Tlaxcala, México” determinó la presencia de Cd, Pb, Ni, Cu, Cr, Zn y As en la cadena alimentaria de la leche de vaca y calculó el factor de bioacumulación, translocación y el valor de transferencia de los metales de la planta a la leche (Castro et al., 2018), así también el estudio denominado “Environmental Risk Assessment of Metals in the Volcanic Soil of Changbai Mountain” determinó la concentración de diversos metales en muestras de suelo y de ceniza volcánica, donde las concentraciones fueron mayores en las zonas ubicadas alrededor del volcán (Ma et al., 2019).

Por su parte en Ecuador las investigaciones sobre la contaminación de la cadena alimentario por MP ha sido escasa, en el año 2009 y 2017 se reportan dos estudios sobre el cadmio, plomo y arsénico provenientes de la ceniza del volcán Tungurahua que afectaron los pastos, cultivos de hortalizas y la producción de leche del cantón Quero y Mocha. El objetivo en ambos casos fue determinar las concentraciones de los metales por espectroscopia de absorción atómica y comparar con los límites máximos permisibles de la normativa INEN y Unión Europea. Las investigaciones demostraron la presencia de los metales en alimentos y pasto en concentraciones que se encuentra dentro de los límites establecidos por las normativas (Polo, 2009 y Romero, 2017). No se han reportado estudios similares en la parroquia Bilbao a pesar de ser una zona afectada por la actividad volcánica del Tungurahua por más de 15 años.

Por tal razón, el objetivo de la presente investigación fue determinar la concentración de metales pesados en el forraje consumido por el ganado vacuno de la parroquia Bilbao y evaluar su incidencia en la cadena alimentaria. La cuantificación de MP en suelo, raíz, forraje y leche de la zona de estudio se realizó por espectroscopia de absorción atómica (EAA) de llama ya que es un método selectivo, rápido y con un grado de sensibilidad y precisión aceptable (Martínez, 2020, pp.8-9). La caracterización fisicoquímica de las diferentes matrices se llevó a cabo mediante las metodologías establecidas por el laboratorio del Grupo Asociado de Investigación en Biotecnología Ambiente y Química (GAIBAQ) de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH. Los factores de bioconcentración (BCF), translocación (TF) y biotransferencia (BTF) se calcularon a partir de las concentraciones de MP obtenidas por EAA y la evaluación de los riesgos para la salud se realizó mediante la estimación del coeficiente de peligro objetivo (THQ), índice de peligro (HI) e ingesta diaria estimada (EDI).

El trabajo que se muestra a continuación se ha estructurado en tres capítulos. En el capítulo I “Marco Teórico” se detallan las bases teóricas que permiten comprender el paso de los metales a

través de la cadena trófica, en el capítulo II “Marco metodológico” se detalla los métodos y técnicas utilizadas tanto para el levantamiento de la información de la parroquia como para los análisis fisicoquímicos y espectroscópicos de las muestras de suelo, raíz, forraje y leche ejecutadas en el laboratorio del grupo de investigación GAIBAQ de la ESPOCH, y en el capítulo III “Resultados y Discusiones” se detallan los resultados obtenidos así como las discusiones realizadas con varios autores y normativas nacionales e internacionales.

## **OBJETIVO (S):**

### **Objetivo General**

Determinar la concentración de metales pesados en el forraje consumido por el ganado vacuno de la parroquia Bilbao y evaluar su incidencia en la cadena alimentaria.

### **Objetivos Específicos**

- Realizar la cuantificación de metales pesados por Espectroscopía de absorción atómica en las muestras vegetales (forraje), suelo y leche cruda de la zona de estudio.
- Evaluar la capacidad adsorptiva del suelo frente a metales pesados a través de un análisis fisicoquímico del suelo, forraje y leche.
- Estimar la capacidad de acumulación y transferencia de metales pesados en el forraje y la leche a través de BCF, TF y BTF.
- Evaluar los parámetros de riesgo para la salud mediante el coeficiente de peligro objetivo, índice de peligro e ingesta diaria estimada en la población de la parroquia Bilbao.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Contaminación del suelo

La contaminación del suelo es descrita como una degradación química o un proceso, en el cual se modifica negativamente el equilibrio físico, químico y biológico por acción natural o antrópica. La degradación del suelo se da por la acumulación de sustancias a niveles tales que repercuten desfavorablemente el comportamiento, de tal modo que las sustancias, a esos niveles de concentración, suponen un nivel tóxico para los organismos del suelo, sus consumidores, o es susceptible de transmitirse a otros sistemas; al tiempo que se produce la pérdida total o parcial de su productividad (Jiménez, 2017, pp.5-6).

Por otro lado, La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) menciona que la contaminación del suelo ocurre cuando la concentración de un químico o sustancia es más alta de la que ocurriría naturalmente sin que necesariamente se cause un daño (FAO y GTIS, 2015; citado en Rodríguez et al., 2019).

#### 1.2. Fuentes de los contaminantes del suelo

Existen dos fuentes de contaminación del suelo por metales pesados (MP), la natural o endógena tales como la alteración del mineral que originan el suelo o las erupciones volcánicas (Barrio, 2017, p.2), y la antropogénica o exógena como la actividad industrial, la minería y el uso indiscriminado de diversos fertilizantes químicos (Londoño et al., 2016: p.146).

##### 1.2.1. Fuentes antropogénicas

Los agroquímicos como los pesticidas son fuente de cadmio, plomo, arsénico, mercurio, cromo, y níquel (Jiménez, 2017: p.7); mientras que los fertilizantes, plaguicidas y estiércol animal son fuente de cobre, cadmio, plomo y mercurio; concentraciones elevadas perjudican el metabolismo de las plantas y la productividad del suelo (Rodríguez et al., 2019: p.15).

### ***1.2.2. Fuentes geogénicas naturales***

Los metales pesados, y de manera general los elementos traza, normalmente están presentes en la corteza terrestre, los suelos y las plantas en concentraciones relativamente bajas (< 1.000 ppm). Los procesos geogénicos naturales que generan metales pesados (MP) al ambiente son la meteorización de la roca madre, las emisiones volcánicas, y la lixiviación de minerales (Galán y Romero, 2009: p.49; Jiménez, 2017, p.44).

### ***1.2.3. Actividad del volcán Tungurahua***

Las erupciones del volcán Tungurahua registradas desde 1999 hasta 2016 aparecieron después de ocho décadas de inactivación, en este periodo de tiempo se presentó una actividad variable de los procesos eruptivos, desde emisiones de ceniza hasta explosiones de gases fuertes, focos de lava, actividad sísmica a corto y largo plazo hasta deformaciones en el suelo (Muller et al., 2018: p.66). Las actividades eruptivas presentaron explosiones bajas, moderadas y fuertes además de la caída de ceniza regional (Samaniego et al., 2011: p.70).

En las erupciones de estos últimos 17 años tuvieron lugar en sucesivas fases eruptivas de tamaño e intensidad diferente, denominadas Grande (L), Moderado (M) y Pequeño (S), mismas que provocaron varios impactos en las comunidades andinas cercanas (Le Pennec et al., 2012: p.94).

La fase de tipo L tuvo lugar en julio y agosto de 2006, febrero de 2008, mayo y diciembre 2010, julio y octubre de 2013 y febrero y abril de 2014 (Neuberg et al., 2017: p.196), estos acontecimientos duraron varias horas e incluso días, con emisiones de flujos piroclásticos, columnas eruptivas altas (5-13 km sobre el cráter ubicado a 5 km a nivel del mar) y actividades de formación, acompañadas por caídas de ceniza y escorrentías (Le Pennec et al., 2012: p.94). La actividad fue dominada por procesos estrombolianos y emplazamientos de flujos de escoria, causando evacuaciones apresuradas, muertes y daños severos en la agricultura, infraestructura y ganadería (Samaniego et al., 2011: p.70).

Las fases de tipo M se dio a fines de 1999, agosto de 2001, octubre de 2003, junio de 2004, entre otras y duró varios días a semanas, se caracterizó por una desgasificación intensa acompañadas por explosiones estrombolianas, chorros de lava y emisiones sostenidas de cenizas, las columnas eruptivas alcanzaban de 2 a 8 km sobre el cráter, con una total ausencia de flujo piroclástico. Algunos eventos de tipo M generaron un impacto severo en las actividades económicas, de manera especial en la agricultura y el turismo (Le Pennec et al., 2012: p.96).

Por otra parte, en las fases de tipo S los impactos eran limitados o nulos en las actividades humanas, debido a la emisión única de cenizas donde la altura de la columna era inferior a 2.5-3 km sobre el respiradero, estas fueron demasiado pequeñas para afectar las áreas pobladas y cultivadas (Le Pennec et al., 2012: p.96).

#### *1.2.3.1. Composición química de la ceniza*

La ceniza volcánica está compuesta de pequeños fragmentos de roca, minerales y vidrio volcánico también llamado óxido de silicio amorfo, es dura, abrasiva, e insoluble en agua. En general, las partículas de ceniza volcánica tienen un diámetro aproximado de 2 mm o menor. Las partículas gruesas de ceniza tienen una apariencia semejante a los granos de arena, mientras que las partículas muy finas son polvo (Casadevall, 1991 citado en; Sánchez et al., 2018: pp.11-12).

La composición química de la ceniza está directamente relacionada con la química del magma que la originó. La composición del magma varía del basalto (bajo en sílice) hasta la riolita (alto en sílice) (Guevara, 2015). Un estudio de la ceniza volcánica del Tungurahua del periodo eruptivo de 2010 indica que la ceniza presenta una composición andesítica, lo que quiere decir que está compuesta principalmente de óxidos de silicio, aluminio, hierro y en menor porcentaje de óxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos, como el CaO, MgO, Na<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>O; contiene, además sales solubles como consecuencia de la condensación de ácidos minerales fuertes durante su formación (Acuña, 2017, p.64).

En cuanto a los metales pesados presentes en la ceniza volcánica, un análisis mineralógico y multielemental de la ceniza del volcán Cotopaxi señaló que los valores medios de concentración de plomo y arsénico se encuentran en 1 ppm (mg/kg) mientras que el cadmio y se encuentran en una concentración menor a 1 ppm (mg/kg), el mercurio por su parte no fue detectable. A más de ello, el estudio concluyó que el azufre y aluminio están presentes en concentraciones elevadas en un rango de 7659 – 8496 ppm y 6917 – 7191 (mg/kg) respectivamente (Sánchez, 2017, pp.28-30).

### **1.3. Metales pesados como contaminantes de suelo**

En general el suelo actúa como una barrera protectora de otros sistemas más sensibles (hidrológicos y biológicos), filtra, descompone, neutraliza o almacena contaminantes evitando en gran parte su biodisponibilidad. Esta capacidad depuradora que caracteriza al suelo depende del contenido en materia orgánica (MO), carbonatos y oxihidróxidos de hierro y manganeso, de la proporción y tipo de minerales de arcilla, de la capacidad de intercambio catiónico, del pH y potencial de oxidación

(Eh), permeabilidad y actividad microbiana. Para cada situación, el poder depurador de un suelo tiene un límite, cuando se superan esos límites para una o varias sustancias, el suelo se contamina y es fuente de contaminantes (Galán y Romero, 2009: p.49; Rodríguez et al., 2019).

El término “metal pesado” hace referencia a cualquier elemento químico metálico que tenga una densidad relativamente alta, mayor a 4 g/cm<sup>3</sup>, peso atómico por encima de 20 y que pueda provocar toxicidad en concentraciones muy bajas, entre ellos están As, Pb, Cd, Hg, Se, etc. Los macro y micronutrientes del suelo son necesarios para el crecimiento y desarrollo de plantas, animales y otros seres vivos, pero si superan ciertos umbrales pueden volverse tóxicos (Jiménez, 2017, p.41).

**Tabla 1-1:** Macro y micronutrientes del suelo, MP que pueden ser esenciales

<b>MP que son micronutrientes esenciales (mg o ug/día)</b>	As, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, V, Zn
<b>Otros micronutrientes esenciales</b>	F, I, Si, Ni, Sn
<b>Macronutrientes (100mg o más / día)</b>	Ca, Cl, Mg, P, K, Na, S
<b>MP no esenciales</b>	Be, Cd, Hg, Pb, Sb, Ti

Fuente: Galán y Romero, 2009: p.49.

### **1.3.1. Plomo**

En la corteza terrestre se encuentra como metal y como sal. Presenta bajos coeficientes de transferencia desde el suelo hacia los alimentos, sin embargo, las plantas son la mayor fuente de su consumo, especialmente las raíces (Goetschel, 2018, p.18). El Pb (II) es la forma más común y reactiva, formando óxido e hidróxidos mononucleares y polinucleares. (Jiménez, 2017, p.51) El suelo puede inmovilizar este elemento gracias a la materia orgánica y la arcilla, pero si el pH se encuentra ácido el plomo es móvil y será tomado por las plantas (Barrio, 2017, p.10).

### **1.3.2. Cadmio**

Forma parte de la composición natural de algunas rocas y suelos; cerca de 25000 toneladas han sido liberadas al medio ambiente (Reyes, et al., 2016: p.68). No se encuentra como metal puro sino asociado a plomo o zinc y las erupciones volcánicas constituyen una fuente natural de contaminación por este metal (Goetschel, 2018, p.27). A bajo pH aumenta la asimilación de Cd por las plantas (Barrio, 2017, p.10).

### **1.3.3. Mercurio**

En el medio ambiente está en forma metálica (Hg 0), o líquido a T° ambiente. Se puede hallar como formas inorgánicas: HgCl<sub>2</sub>, HgBr<sub>2</sub>, HgO o como formas orgánicas: metilmercurio [CH<sub>3</sub>Hg]<sup>+</sup>; fuentes naturales de este elemento son la actividad volcánica e incendios forestales. En alimentos vegetales el mercurio se encuentra en cantidades indetectables por la baja absorción, en cambio que en la red trófica acuática es más susceptible a acumularse (Goetschel, 2018, pp.22-24).

### **1.3.4. Arsénico**

El arsénico es clasificado como metaloide, en la naturaleza se encuentra en dos formas como Arsenito III (más abundante) o como Arsenato V; las erupciones volcánicas y la meteorización de arsenopirita constituyen una fuente natural de contaminación por este metal, (Goetschel, 2018, p.36). La concentración de As en el suelo depende del pH y actividad biológica, su disponibilidad para las plantas está restringida por la presencia de hierro, arcilla y materia orgánica (Barrio, 2017, p.11).

### **1.3.5. Selenio**

El selenio se encuentra ampliamente distribuido en forma orgánica e inorgánica en la mayoría de las rocas y suelos; gran parte de las especies orgánicas contienen selenio en estado (-2), y las especies inorgánicas como los selenatos y selenitos presentan estados de oxidación más altos. Los selenitos inorgánicos y los selenatos se caracterizan por presentar mayor solubilidad en agua, por lo que presentan una mayor biodisponibilidad. El pH, el potencial redox y la presencia de óxidos metálicos afectan a la biodisponibilidad del selenio (Molina, 2019, p.3).

## **1.4. Disponibilidad de metales pesados en el suelo**

Los metales pesados (MP) pueden encontrarse en el suelo en diversas formas: como componentes orgánicos (intercambiables), en solución del suelo (disueltos), precipitados con otros componentes (insolubles) y como componentes estructurales de celosías; de estas solo las dos primeras son absorbidas por las plantas (Zeng et al., 2011: p.85).

En general los MP siguen cierta dinámica en el suelo que implica cuatro vías diferentes: la primera, quedar retenidos en el suelo ya sea por precipitación, adsorción, complejación o de forma disuelta y

fija (Navarro et al., 2007: p.3). La segunda, ser adsorbidos encima de componentes inorgánicos; la tercera, incorporarse al suelo a través de la materia orgánica y la cuarta, como sólidos mixtos o puros de forma precipitada (Prieto et al., 2009: p.5). El desplazamiento de los MP suele ser muy bajo quedándose retenidos en los primeros horizontes del suelo y decreciendo su concentración en los horizontes inferiores (Galán y Romero, 2008: p.49). La distribución puede ser inicialmente rápida y después lenta, esto dependerá del tipo de metal, tiempo, el nivel de profundidad alcanzada en el suelo, así como por las propiedades del suelo.

Así también, los MP pueden ser movilizados hacia aguas subterráneas o superficiales; ser volatilizados hacia la atmósfera o absorbidos por parte de plantas para su posterior integración a la cadena trófica (Navarro et al., 2007: p.4).

#### ***1.4.1. Factores que influyen en la disponibilidad de metales pesados***

La movilidad y disponibilidad de los MP en los siguientes niveles de la cadena trófica dependen de las propiedades de adsorción y desorción que presenten los suelos; y de factores que influyan en dicha adsorción y desorción tales como: complejo arcilloso-húmico, textura, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, potencial de hidrógeno (pH), conductividad eléctrica (CE), entre otras (García et al., 2002: p.3).

##### ***1.4.1.1. Proceso de Adsorción***

La adsorción se considera como la retención de moléculas, átomos o iones en la superficie de los receptores de un sólido durante un tiempo. Los mecanismos que producen esta asociación son las fuerzas de Van der Waals (adsorción física) y las fuerzas de enlace puente de hidrógeno o iónico (adsorción química) (Barrio, 2017, p.5).

La única forma en que los metales pueden ser captados por la biota del suelo y los vegetales es cuando estos se encuentran en forma iónica. La mayoría de los metales se hallan en formas catiónicas simples, pero casos como el arsénico y cromo forman oxianiones más complejos. En el suelo los metales son adsorbidos sobre la superficie de humus, minerales de arcilla, oxihidróxidos de hierro y manganeso y ciertas sales escasamente solubles como por ejemplo el carbonato de calcio (Rodríguez et al., 2019: p.40).

#### *1.4.1.2. Complejo arcilloso-húmico*

El complejo arcilloso-húmico es una mezcla de arcilla y humus, un tipo de -pasta pegajosa- cuya función se asemeja a un imán, que cargado negativamente atrae y retiene elementos cargados positivamente (cationes). Entre los cationes fijados, el hidrógeno es el más enérgicamente retenido; después le siguen: el calcio, el magnesio, el amonio, el potasio y, finalmente, el sodio, mal retenido. Ningún anión se fija, excepto el anión de fosfato, que aprovecha un puente formado por los cationes de calcio (Espinoza, et al., 2018: p.3).

Debido a que las arcillas presentan elevada carga negativa, aquellos suelos que tengan grandes cantidades de arcillas, tendrán una capacidad de intercambio catiónico (CIC) mayor, pero a medida que tiene más materia orgánica (MO) ve incrementado su valor por decenas de veces (Espinoza, et al., 2018: p.3).

El complejo arcilloso-húmico es la gran reserva de elementos nutritivos para la planta. Este complejo debe ser capaz de fijar el máximo de cationes cambiables ya que actúa como despensa de nutrientes (Milian, 2015, p.10).

#### *1.4.1.3. Textura del suelo*

La textura del suelo indica la proporción de los componentes inorgánicos del suelo, arena, limo y arcilla. Esta propiedad influye en la fertilidad, capacidad de retención de agua, aireación y contenido de materia orgánica (FAO, 2016; citado en Novillo et al., 2018: p.178).

Las proporciones combinadas de arena limo y arcilla en un suelo determinan su clasificación textural. Las partículas de arena presentan un tamaño entre 0,05 y 2 mm, son generalmente granos de sílice o vestigios rocosos variados, sin ninguna cohesión entre ellos, la arena favorece la permeabilidad del agua y aire. Las partículas de limo son más pequeñas comprenden un tamaño entre 0,05 y 0,002 mm y engloba los elementos de cualquier naturaleza química. Las arcillas por su parte son la fracción más fina del suelo y comprende partículas con un tamaño menor a 0,002 mm (Camacho, et al., 2017: p.5).

La estructura del suelo es diferente de la textura, puesto que se refiere a cómo las partículas de arena, limo y arcilla se pegan entre sí gracias a la materia orgánica para forman los terrones o agregados del suelo. La permeabilidad de un suelo al aire y agua está ligada al volumen ocupado por los poros que se forman entre los terrones (Innovatione AgroFood Design, 2019).

#### *1.4.1.4. Materia Orgánica*

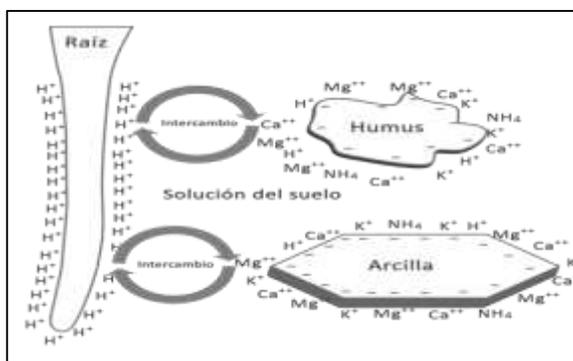
La materia orgánica (MO) está compuesta por residuos vegetales y animales en diferentes grados de descomposición, su aspecto varía, desde materiales poco degradados que se distinguen a simple vista hasta el material poco oscuro, similar a una tierra negra, granulosa, porosa que se conoce como Humus. Al igual que las arcillas la MO está compuesta por partículas cargadas eléctricamente que incrementan la capacidad del suelo para almacenar nutrientes y tenerlos disponibles para las plantas. Además, esta propiedad hace que el suelo sea más poroso conservando su estado de aireación, humedad y temperatura (Konijnenburg, 2006, p.7).

#### *1.4.1.5. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)*

El intercambio iónico es el mecanismo que tiene el suelo para retener y liberar iones cargados positivamente por otros que están en solución (Barrio, 2017, p.5). Esta capacidad de intercambio que ocurre en las superficies cargadas se da gracias al contenido de materia orgánica y los minerales de arcilla. Los iones o moléculas cargadas negativamente (aniones) por su parte están generalmente unidos más débilmente al suelo y reaccionan con la materia orgánica mediante puentes de hidrógeno y el intercambio de ligandos (Gevao et al., 2000, citado en Rodríguez et al., 2019: p.40). En función del pH de la solución del suelo, los estados de oxidación de algunos iones o moléculas pueden pasar de estados catiónicos a neutrales o aniónicos; por lo tanto, su absorción está en función del pH del suelo (Rodríguez et al., 2019: p.40).

Así también, los cambios en la presencia o ausencia de oxígeno debido a las condiciones cambiantes de la humedad del suelo originan cambios en los estados de oxidación de algunos iones y moléculas pudiendo ser un factor importante en la movilidad estos contaminantes (Rodríguez et al., 201: p.41).

En general, un aumento en la CIC provoca que los metales se encuentran mayor tiempo disponibles para las plantas dado que incrementa la capacidad del suelo de fijarlos (Roca, 2016).



**Figura 1-1.** Capacidad de intercambio catiónico

Fuente: Bonsai Menorca, 2012.

#### 1.4.1.6. Potencial de hidrógeno

El potencial de hidrógeno (pH) del suelo controla las reacciones químicas que determinan si los nutrientes van a estar o no disponibles (solubles o insolubles) para ser absorbidos por las plantas. Muchos procesos de adsorción de MP al complejo arcilloso-húmico son dependientes del pH. La alcalinidad del suelo permite que la adsorción sea más alta, mientras que las condiciones ácidas, así como las condiciones anaeróbicas por la saturación de agua favorecen la desorción y liberación de los metales de nuevo a la solución (Rodríguez et al., 2019: p.41).

#### 1.4.1.7. Conductividad eléctrica

La salinidad del suelo (conjunto de todas las sales solubles) se determina mediante la conductividad eléctrica (CE), este parámetro permite medir el riesgo potencial de daño a una planta debido a las sales presentes en el suelo, un aumento en la CE traerá como consecuencia una disminución de rendimiento ya que se verá afectado el crecimiento de las plantas (Espinoza, et al., 2018: p.3).

Los principales iones que comprenden las sales solubles que dan lugar a la salinidad del suelo son los cationes: calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y los aniones: cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Gallart, 2017, p.25).

#### 1.4.1.8. Densidad

El suelo como todo cuerpo poroso presenta dos densidades, la aparente y la real. La Densidad aparente ( $D_a$ ) se define como la masa seca del suelo por unidad de volumen de suelo inalterado, que

incluyendo los espacios porosos. Este parámetro es un buen indicador de la compactación, porosidad, grado de aireación y capacidad de infiltración, lo que condiciona la circulación de agua y aire en el suelo, los procesos de establecimiento de las plantas (emergencia, enraizamiento) y el manejo del suelo. Los valores dependen de factores como la textura, estructura, contenido de materia orgánica (MO), y se ve alterado debido a variaciones en la cantidad y calidad del espacio poroso (Rubio, 2019, pp.22-23).

Por otro lado, la densidad real ( $D_r$ ) es la relación entre la unidad de peso y la unidad de volumen de la fase sólida del suelo. En la mayoría de los suelos, el valor promedio de la  $D_r$  es  $2,65 \text{ g/cm}^3$  variando en función de la composición química y mineralógica del suelo. De tal manera que, cuanto más materia orgánica presenta un suelo, menor es la densidad de la fase sólida (Andrades et al., 2015: p.35).

### **1.5. El suelo como fuente de nutrientes minerales**

El suelo es considerado como la fuente más importante de nutrientes, motivo por el cual las plantas requieren de diferentes elementos esenciales para un correcto desarrollo, estos elementos se dividen en macro y micronutrientes; el C, H y O se obtienen del agua ubicada en el suelo, siendo absorbida por la raíz de las plantas y del dióxido de carbono presente en la atmósfera (Bonadeo et al., 2017: p.225). Los nutrientes que deben estar en mayores cantidades para ser aprovechados por los cultivos son los macro nutrientes necesarios para el correcto desarrollo y la subsistencia de la planta, este grupo está conformado por los siguientes elementos: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K) a diferencia de los macro, los micronutrientes deben estar en menores cantidades, en este grupo están los elementos siguientes: Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Cloro (Cl), Azufre (S), el déficit de alguno de estos elementos ocasiona desordenes fisiológicos en la planta (FAO, 2013, p.11).

El NPK, conocido como el trio de elementos principales los cuales son nitrógeno, fósforo y potasio, tienen la ventaja de ser transferidos de las hojas viejas a las hojas jóvenes, por tal motivo la misma molécula es utilizada varias veces por la planta. Los procesos implicados en la liberación y fijación de elementos nutritivos en el suelo incluyen disolución-precipitación y adsorción-desorción (Casal, 2007, p.64; Singh y Schulze, 2015).

Una deficiencia de los nutrientes tiene consecuencias negativas sobre la fisiología de las plantas, pero esto va a depender del tipo de elemento y de la concentración. Por ejemplo, una deficiencia de nitrógeno genera un fenómeno denominada clorosis, lo cual provoca el amarillamiento de las hojas

viejas, la deficiencia de fósforo genera un oscurecimiento en las hojas viejas y un déficit de potasio provoca la aparición de manchas necróticas (Casal, 2007, p.65).

### **1.5.1. Absorción de iones**

Los nutrientes son absorbidos por las plantas una vez que se encuentren disueltos en agua y se haya producido la disociación de iones, caracterizados por tener carga positiva (cationes) o negativa (aniones); siendo esta la forma absorbible de los nutrientes, por tal motivo, el suelo debe ser capaz de retener los iones para que estos puedan ser aprovechados por las plantas (Casal, 2007, p.66).

La matriz del suelo se encuentra formado por compuestos inorgánicos tales como arena, limo y arcilla; además, contiene compuestos orgánicos que proceden de la descomposición de restos de organismos vivos. En los compuestos inorgánicos como orgánicos predomina la carga negativa, por tal motivo, cationes como el potasio ( $K^+$ ), calcio ( $Ca^{2+}$ ), magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y hierro ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) son atraídos y retenidos por la matriz del suelo con cargas negativas, para de esta manera liberar a la solución acuosa otro catión, el cual va a ser absorbido por la raíz de las plantas, este proceso es llamado capacidad de intercambio catiónico (Singh y Schulze, 2015).

Los aniones como el nitrógeno, fósforo y azufre son retenidos por porciones de la matriz con carga positiva la cual es muy reducida, por lo que una gran cantidad de aniones quedan disueltos en la solución acuosa y son absorbidos por la raíz de las plantas. La forma absorbible del nitrógeno es el nitrato ( $NO_3^-$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ), la forma asimilable del fósforo es el ion fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) y del azufre el ion sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) (Casal, 2007, p.66).

El protón hidrógeno ( $H^+$ ) también se encuentra disponible en la solución del suelo y de la concentración de este va a depender el grado de acidez, este parámetro es importante para la disponibilidad de los iones necesarios para la planta, siendo el rango de moderadamente ácido (5-7) el adecuado para la correcta absorción. Un pH inferior a 5 disminuye la correcta absorción aniones, mientras que un pH alcalino afecta la absorción de aniones (Bonadeo et al., 2017: p.188).

## **1.6. Impactos de la contaminación del suelo en la cadena alimentaria**

La contaminación del suelo tiene un impacto negativo en la seguridad alimentaria puesto que la acumulación de contaminantes afecta la producción y calidad agrícola volviéndolos inseguros para el consumo humano. El 95 % de la producción de alimentos depende del suelo, por eso solo si los suelos son saludables se pueden producir alimentos seguros y de calidad (FAO y GTIS, 2015).

### **1.6.1. Contaminación del suelo, absorción por las plantas y contaminación de la cadena alimentaria**

El contenido de nutrientes o contaminantes en los tejidos de una planta está directamente relacionado con el contenido de estos en el suelo, así como con la capacidad de intercambio de iones y agua entre el suelo y las raíces de la planta. En el caso de los metales la absorción a través de las raíces es una de las principales rutas de entrada a la cadena alimentaria. Por otro lado, la contaminación altera además la biodiversidad, reduce la materia orgánica y la capacidad del suelo para actuar como filtro, lo que genera un desequilibrio de los nutrientes del suelo (FAO, 2015; Zhang et al, 2015).

De acuerdo al riesgo que presentan los metales al ingresar en la cadena alimentaria se los ha clasificado en 4 grupos (Chaney, 1980; citado en Rodríguez, et al, 2019: p.49).

**Tabla 2-1:** Metales clasificados en grupos según su potencial de riesgo para la cadena alimentaria a través de la absorción por las plantas

<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
Plata (Ag)	Mercurio (Hg)	Boro (B)	Arsénico (As)
Cromo (Cr)	Plomo (Pb)	Cobre (Cu)	Cadmio (Cd)
Estaño (Sn)		Manganeso (Mn)	Cobalto (Co)
Titanio (Ti)		Molibdeno (Mo)	Molibdeno (Mo)
Itrio (Y)		Níquel (Ni)	Selenio (Se)
Zirconio (Zr)		Zinc (Zn)	Talio (Tl)

Fuente: Rodríguez et al., 2019.

En el Grupo 1 constan los elementos que presentan menor riesgo de contaminación, se caracterizan por tener una solubilidad baja, por tal motivo la absorción por las plantas es insignificante. El Grupo 2 está están presentes los metales con una fuerte adsorción a la superficie del suelo, por lo que no se movilizan con facilidad a las partes comestibles de la planta, siendo el riesgo de contaminación bajo. Sin embargo, generan un riesgo para la salud tanto de animales como humanos si se da la ingestión de suelo contaminado (Rodríguez, et al, 2019: p.49).

En el Grupo 3 se encuentran los elementos absorbidos con facilidad por las plantas, las concentraciones de estos elementos que generan fitotoxicidad no causan un riesgo para la salud de las personas. El Grupo 4 se caracteriza por contener elementos que generan un alto riesgo de contaminación y por ende pueden generar problemas en la salud de personas y animales. Las

concentraciones con las que causan riesgos en la salud de humanos y animales no generan problemas de fitotoxicidad en la planta. (Rodríguez, et al, 2019: p.49).

### **1.6.2. Factores BCF, TF y BTF**

Existen factores que permiten evaluar la capacidad que tienen las plantas para acumular y transferir metales del suelo a la parte aérea y de la planta a la leche.

#### **1.6.2.1. Factor de bioconcentración (BCF)**

El BCF permite conocer la relación existente entre la concentración de un metal presente en la raíz de la planta y la concentración en el suelo. Un valor de BCF superior a uno indica que una planta es un hiperacumulador, mientras que un valor inferior a uno es indicativo de que es excluyente (Usman et al., 2019: p.3).

- Para la determinación del factor de bioacumulación en la raíz de la planta se emplea la siguiente fórmula (Castro et al., 2018):

$$BCF = \frac{[Concentración\ del\ metal]Raíz}{[Concentración\ del\ metal]Suelo}$$

- Para la determinación del factor de bioacumulación en la parte aérea de la planta se emplea la siguiente fórmula (Vyslouzilová, 2003):

$$BAF = \frac{[Concentración\ del\ metal]Parte\ aérea}{[Concentración\ del\ metal]Suelo}$$

#### **1.6.2.2. Factor de translocación (TF)**

El valor de TF determina la eficiencia de la planta en transportar el metal desde la raíz hasta la parte aérea. Una planta se considera eficiente en este proceso cuando TF es mayor que uno; esto se debe a un eficiente sistema de transporte de metales. Sin embargo, los valores de TF inferiores a uno indican una transferencia de metal ineficaz, lo que sugiere que este tipo de plantas acumulan metales en las raíces y rizomas más que en los brotes o las hojas. Para la determinación del factor de translocación se emplea la siguiente fórmula (Usman et al., 2019: pp.1-2):

$$TF = \frac{[Concentración\ del\ metal]Parte\ comestible}{[Concentración\ del\ metal]Raíz}$$

### 1.6.2.3. Factor de biotransferencia (BTF)

El nivel de transferencia de los MP a la leche se lo calcula a través del factor de biotransferencia (BTF). Los metales se excretan en la leche mediante un proceso de primer orden. Para la determinación del BTF se emplea la siguiente fórmula (Castro et al., 2018):

$$BTF = \frac{[Concentración\ del\ metal\ leche](mg\ kg^{-1})}{Consumo\ promedio\ diario\ del\ metal\ (mg\ día^{-1})}$$

### 1.6.3. Riesgos para la salud humana asociados a la contaminación de alimentos con metales pesados

La contaminación ambiental genera un riesgo en la seguridad alimentaria de la población, por lo que existen diversos factores que nos permiten evaluar los efectos tóxicos de los MP, tales como el tipo de metal, concentración, características químicas del metal y en algunos casos la edad de la población expuesta. Por tal motivo, diversos estudios que evalúan la contaminación de MP en alimentos mencionan que el cadmio, el mercurio, el plomo y el arsénico, deben ser minuciosamente monitoreados (Reyes et al., 2016: p.68).

#### 1.6.3.1. Cadmio

El cadmio tiende a acumularse en el hígado y en el riñón, produciendo daños severos aún en concentraciones reducidas. Además, puede permanecer en estos órganos durante mucho tiempo. Así, el tiempo de vida media del cadmio en el riñón puede alcanzar los 30 años (Reyes, et al., 2016: p.68; Goetschel, 2018, p.13).

#### 1.6.3.2. Plomo

Tiende a distribuirse en diferentes órganos, tejidos, huesos y dientes, donde se va acumulando con el paso del tiempo, desplaza al calcio, causa anemia asociada a neurotoxicidad y deterioro cognitivo permanente. La intoxicación por plomo varía de acuerdo a la edad de la persona y el nivel de

exposición. El consumo a largo plazo de Pb causa falla renal, hipertensión, carcinogénesis, teratogénesis, pérdida de peso, osteomalacia, osteoporosis (Reyes et al., 2016: p.69; Goetschel, 2018, p.19).

#### *1.6.3.3. Mercurio*

El metilmercurio es una de las formas con elevada toxicidad y es muy fácilmente incorporado en la cadena alimenticia y bio-acumulado en seres vivos. Afecta principalmente al sistema nervioso y puede producir graves daños en el cerebro en estado fetal. Es activamente perjudicial para el sistema cardiovascular y puede ser cancerígeno (Reyes et al., 2016: p.69).

#### *1.6.3.4. Arsénico*

Elevadas concentraciones de As inorgánico presentan diferentes afectaciones en la salud humana tales como: enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales y efectos cancerígenos. El arsénico está clasificado en el grupo I de sustancias cancerígenas por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) (Reyes et al., 2016: p.69).

#### *1.6.3.5. Selenio*

A bajas dosis el selenio es necesario para el funcionamiento de la tiroides además que actúa como antioxidante, sin embargo, la exposición a altos niveles puede producir efectos adversos. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) indica que el selenio y sus compuestos no son considerados carcinogénicos en seres humanos. Sin embargo, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) ha determinado que una forma específica de selenio, el sulfuro de selenio es probablemente carcinogénica en seres humanos (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2016).

### **1.7. Parámetros de evaluación de riesgos para la salud**

#### *1.7.1. Cociente de peligro objetivo*

El cociente de peligro objetivo o THQ se define como la relación de exposición al elemento tóxico y la dosis de referencia que es el nivel más alto en el que no se esperan efectos adversos para la

salud, permite determinar el riesgo no cancerígeno asociado con cada metal pesado y muestra. El THQ <1 significa que se supone que la población expuesta es segura. La ecuación para TQH es (Antoine et al., 2017):

$$THQ = \frac{E_{FR} \times E_d \times F_{IR} \times C}{RfD \times BW_a \times AT_n} \times 10^{-3}$$

Donde  $E_{FR}$  es la frecuencia de exposición al oligoelemento,  $E_d$  es la duración de la exposición,  $F_{IR}$  es la tasa de ingesta de alimentos en gramos por día para el alimento respectivo,  $C$  es la concentración en peso húmedo del elemento traza en el alimento dado,  $RfD$  es la dosis de referencia oral del oligoelemento en  $\mu\text{g} / \text{g} / \text{día}$ ,  $BW_a$  es el peso corporal de referencia y  $AT_n$  es el tiempo de exposición promedio y  $10^{-3}$  es el factor de conversión de unidades (Antoine et al., 2017).

### **1.7.2. Índice de peligro**

El índice de peligro o HI es la suma de los cocientes de riesgo objetivo individuales de los elementos evaluados para cada tipo de alimento. El HI supone que el consumo de un tipo de alimento en particular daría como resultado una exposición simultánea a varios elementos potencialmente tóxicos. Incluso si los THQ individuales para los elementos del alimento son inferiores a la unidad individualmente, el efecto acumulativo del consumo puede tener efectos adversos para la salud. Si el HI es > 1, existe la posibilidad de efectos adversos no cancerígenos para la salud. La ecuación para HI es (Antoine et al., 2017):

$$HI = \sum_{N=1}^i THQ_n$$

### **1.7.3. Ingesta diaria estimada**

La ingesta diaria estimada o EDI de los elementos de interés se determina en función de su concentración promedio en cada tipo de muestra de alimento y la ingesta diaria ( $F_{IR}$ ) en gramos de los respectivos alimentos. Además, el peso corporal del ser humano puede influir en la tolerancia a los contaminantes. El EDI de los metales se calcula mediante la siguiente ecuación (Antoine et al., 2017):

$$EDI = \frac{(C \times F_{IR})}{BW_a}$$

## **1.8. Leche**

La leche es una suspensión coloidal, blanquecina y de composición compleja, secretada por las glándulas mamarias a través del ordeño higiénico de vacas que se encuentran en un buen estado de salud. La leche debe estar libre de cualquier tipo de contaminación, debido a que es destinada para el consumo en su forma natural o procesada (Gigli, 2014, p.49; NTE INEN 9: 2008).

### ***1.8.1. Composición***

Los componentes de la leche se encuentran en un estado de equilibrio, dando como resultado la formación de un sistema fisicoquímico estable; los principales componentes de la leche son agua, proteínas, grasas, azúcares, vitaminas y minerales, además en su composición se encuentran otras sustancias en menor concentración (Badui, 2012, p.604).

A excepción del agua estos elementos son conocidos como sólidos totales, representando del 12-14 % de la composición de la leche, el resto es agua; la concentración de estos compuestos varía de acuerdo a varios factores tales como: ambientales (tipo de alimentación, forma de ordeño, etc.), genéticos (raza y edad), estado de salud de la vaca y de la etapa de lactancia. (Tamime, 2009, p.24).

La leche al ser una suspensión coloidal está conformada por dos fases: la dispersa y dispersante. El agua conforma la fase dispersante, ya que en ella se encuentran disueltas las sales minerales, los azúcares como la lactosa y algunas proteínas, la fase dispersa está constituida por los glóbulos de grasa emulsionados y por las proteínas caseínas (Gigli, 2014, p.49).

A continuación, se muestra los componentes en porcentaje (tabla 3-1).

**Tabla 3-1:** Composición de la leche del ganado vacuno.

Componente	Porcentaje (%)
<b>Proteínas</b>	3,25
<b>Caseínas</b>	2,78
<b>Seroproteínas</b>	0,47
$\alpha$ -lactoalbúmina	0,063
$\beta$ -lactoglobulina	0,251
Seroalbúmina	0,051
Lactoferrinas	0,040
Otras	0,027
<b>Grasa</b>	3,76
<b>Carbohidratos</b>	4,84
Lactosa	4,70
<b>Sales</b>	0,80

Fuente: Badui, 2012.

#### *1.8.1.1. Lactosa*

La lactosa es un disacárido formado por la condensación de una molécula de glucosa y una de galactosa, es considerada el azúcar más abundante en la leche, pero también es uno de los menos estables frente a la acción microbiana; debido a que la lactosa es convertida en ácido láctico u otros ácidos alifáticos lo cual en algunos casos suele ser beneficioso, pero en otros perjudicial (Alaís, 1985, p.33 y Badui, 2012, p.616).

La leche de vaca tiene un contenido aproximado de lactosa del 4,7%, generalmente se menciona que el contenido de este azúcar es inversamente proporcional al contenido de sales presentes en la leche (Alaís, 1985, p.33 y Badui, 2012, p.616).

#### *1.8.1.2. Grasa*

La grasa de la leche también es conocida como grasa butirosa debido a que contiene una gran cantidad de ácido butírico el cual solo se encuentra presente en la leche. La grasa está constituida aproximadamente por más de 400 ácidos grasos diferentes, del total de contenido de grasa el 96% lo constituyen solo 14 ácidos grasos, encontrándose en mayor porcentaje el ácido mirístico, palmítico

y oleico. La gran variedad de ácidos grasos se debe a varios factores como la dieta del ganado vacuno, la actividad del microbiota intestinal del rumen y de la actividad celular (Badui, 2012, pp.613-615).

Los ácidos grasos se encuentran como estructuras químicas complejas a las que se les denomina lípidos, los triacilglicerolos son considerados el principal lípido lácteo correspondiente al 98%, los fosfolípidos conforman el 1 % y el 1% restante está conformado por mono y diglicéridos, esteroides, vitaminas liposolubles y otros lípidos (Christie, 1995 citado en Tamime, 2009, p.29).

La leche tiene un contenido de grasa entre 3,3% y 3,7%; el estado físico de la grasa de la leche está dado por la relación que existe entre los diferentes tipos de ácidos tales como saturados, insaturados y de cadena corta, también están relacionados con la susceptibilidad a reacciones químicas las cuales influyen sobre el sabor de la leche y sus productos lácteos. Un pequeño porcentaje de ácidos grasos se encuentran libres, pero al incrementarse la liberación de ácidos de cadena corta se produce una rancidez hidrolítica, la cual es producida por enzimas lipasas que pueden ser originadas por microorganismo contaminantes (Badui, 2012, pp.613-615).

#### *1.8.1.3. Proteínas*

Las proteínas son macromoléculas formadas por unidades más pequeñas llamadas aminoácidos, fundamentalmente están compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno, junto con otros elementos como el azufre (S), el fósforo (P) y el hierro (Fe). Es posible diferenciar dos grupos proteicos en base al estado de dispersión en la leche, teniendo así las caseínas y las proteínas séricas o solubles (López y Barriga, 2016, p.6).

Las caseínas conforman el 80% del total de las proteínas, su estructura está conformada por carbohidratos y fosfatos, por tal motivo son denominadas como fosfoglicoproteínas. Dentro de las caseínas, existen cuatro tipos, alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), kappa ( $\kappa$ ) y gamma ( $\gamma$ ) en proporciones variables, las moléculas de caseína se agrupan entre sí formando esferas dispersas que son llamadas micelas, pero una pequeña cantidad se encuentra en solución. Estas proteínas precipitan a un pH de 4,6 a una temperatura de 20 °C (Badui, 2012, pp.611).

Las proteínas del suero o proteínas solubles se encuentran en menor proporción que las caseínas, representando el 20% de las proteínas totales. Las proteínas solubles están formadas principalmente por  $\alpha$ -lactoalbúminas,  $\beta$ -lactoglobulinas, seroalbúminas (SA), inmunoglobulinas, proteasas peptonas. Estas proteínas contienen la mayoría de los aminoácidos por tal motivo su valor nutritivo es superior (Tamime, 2009, p.32).

La b-lactoglobulina se encuentra en mayor porcentaje en la leche del ganado vacuno, suma aproximadamente 45% del total de las proteínas del suero, además ejerce una influencia decisiva en la estabilidad térmica de los productos lácteos (Tamime, 2009, p.32).

La albúmina sérica (SA) es la proteína más abundante en el sistema circulatorio de la vaca, y consiste en aproximadamente el 50% de la proteína en el suero sanguíneo bovino, pero está presente sólo en pequeñas cantidades en la leche. La SA sirve de transporte de ácidos grasos; contiene un alto número de cistinas, diecisiete enlaces disulfuro y un grupo sulfhidrilo libre (Tamime, 2009, p.32; Badui, 2012, p.615).

#### *1.8.1.4. Sales*

Las principales sales que conforman la leche son los fosfatos, citratos, cloruros y bicarbonatos de Na, K, Ca y Mg, las cuales se encuentran en solución o formando parte de las micelas. Las sales cumplen un rol primordial en la estabilidad térmica de los productos lácteos, por tal motivo si se agrega calcio y/o magnesio, el sistema proteico se desestabiliza; por el contrario, si se agrega citratos y fosfatos el sistema proteico se estabiliza (Badui, 2012, p.617).

Los niveles de sales en la leche también son utilizados para evaluar si el ganado vacuno presenta enfermedades, debido a que cuando padecen mastitis se produce una mayor producción de cloruros (Badui, 2012, p.617).

#### *1.8.2. Mecanismos de fijación de MP*

Una vez absorbidos y en el torrente sanguíneo, los metales pesados se unen a proteínas plasmáticas, generalmente a la albúmina, dando lugar a un tóxico ligado. La unión de las proteínas al tóxico puede darse por enlaces iónicos a los grupos amino, mediante adsorción por fuerzas de Van der Waals (unión lábil) o por unión a grupos sulfhidrilo (-SH), etc. Siendo este último enlace el más importante con respecto a los MP, los cuales se unen a proteínas con grupos SH formando complejos muy estables, hasta el punto de que in vitro llegan a precipitar las proteínas; en muy pocas ocasiones los MP se unen a través de enlaces fuertes como los covalentes (Repetto, 2009, p.70).

La magnitud del efecto tóxico sólo depende del tóxico libre, por lo tanto, la fracción ligada constituye un medio de almacenamiento, la cual transferirá más tóxico libre para ser distribuido en los tejidos del organismo. Sólo la fracción libre es la toxicológicamente activa por ser capaz de atravesar las membranas biológicas y llegar al lugar selectivo donde ejercerá su efecto (Repetto, 2009, p.70).

### **1.8.3. Excreción de MP**

Por la vía láctea se eliminan gran cantidad de sustancias. La leche es rica en grasas, de ahí que se eliminen compuestos cuyo coeficiente de lipo/hidrosolubilidad sea alto como es el caso de los pesticidas organoclorados y MP de tipo apolar; contiene calcio que favorece la eliminación de metales ligados a él, y su pH es ligeramente ácido lo cual favorece la eliminación de sustancias básicas (Repetto, 2009, pp.70-71).

### **1.9. Límites máximos permisibles de metales pesados en alimentos**

- La comisión FAO/WHO del Codex Alimentarius 193:1995 y la NTE INEN 9:2012 han establecido como límite máximo de Pb en leche 0,02 mg/kg.
- La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) (2001) estableció como límite máximo de ingesta oral de mercurio 0.0001 mg/kg.
- Para el arsénico, la Comisión Mixta FAO/WHO del Codex Alimentarius ha fijado la máxima ingesta tolerable de 2 µg/kg de peso corporal. Para la leche la FAO/OMS han determinado como tolerable una ingestión diaria para el ser humano de 0,05 mg/kg de peso. US EPA (1995) establece como dosis de referencia para exposición oral en alimentos de 0,004mg/kg.
- La US EPA (1989) estableció como límite máximo de ingesta oral de cadmio en alimentos es de 0,001 mg/kg.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Materiales, equipos y reactivos

##### 2.1.1. *Materiales*

- Equipo de bioseguridad (mandil, guantes, mascarilla).
- Vidrio reloj
- Espátula
- Varilla de agitación
- Probetas de 50 mL, 100 mL y 1000mL
- Vasos de precipitación
- Matraz de 250 mL y 125 mL
- Embudos de vidrio
- Balones de aforo de 1000 mL, 100 mL y 50 mL
- Pipetas volumétrica de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Micropipeta
- Tubos con tapa de 10 mL
- Tubos falcon de 50 mL
- Gradillas
- Pissetas
- Papel filtro
- Crisoles

##### 2.1.2. *Equipos*

- Balanza analítica
- Espectrofotómetro visible HACH DR 2800
- pHmetro: pHmeter GLP 22 Erison
- Estufa de secado Heraeus D-63450
- Centrífuga de tubos falcon
- Mufla

- Agitador
- Fotómetro de llama
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Reverberos
- Lactoscan
- Espectrofotómetro de absorción atómica

### 2.1.3. *Reactivos*

- Agua destilada
- Ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ )
- $H_2SO_4$  de 1000 ppm
- Nitrato de plata 0,0141N ( $AgNO_3$ )
- Cromato de potasio al 5% ( $K_2CrO_4$ )
- Reactivo PhosfaVer 10
- Reactivo NitraVer 10
- Reactivo SulfaVer 10
- Sulfato de cobre ( $CuSO_4$ )
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Molibdato de amonio
- Tartrato de antimonio y potasio
- Ácido ascórbico
- Fosfato monopotásico ( $(KPO_4H_2)$ )
- Ácido nítrico conc. ( $HNO_3$ )
- Ácido perclórico
- Ácido clorhídrico 0,5M
- Azul de metileno
- Solución acuosa de alcohol etílico 75%
- Alizarol: solución alcohólica de alizarina al 0,2% m/v
- Etanol
- Solución acuosa de cloruro férrico al 1%
- $H_2SO_4$  diluido (1:1)

- Solución de yoduro de potasio (KI) 35%
- Solución de KI 7,5%
- Ácido acético
- Solución de Lugol
- Borohidruro de sodio
- Hidróxido de sodio

## **2.2. Técnicas y Métodos**

### **2.2.1. Levantamiento de la información mediante encuestas**

#### **2.2.1.1. Metodología de encuestas**

El levantamiento de información de la presente investigación se realizó mediante encuestas dirigidas a los habitantes de las cinco comunidades de la parroquia Bilbao (Santa Cruz, Motilones, Chontapamba, Yuibug y el centro parroquial), del cantón Penipe, provincia de Chimborazo, con la finalidad de recopilar información sobre las actividades agropecuarias a las que se dedican los pobladores para establecer un plan de muestreo en las zonas afectadas ante la caída de ceniza del volcán Tungurahua y que han provocado contaminación de suelo, forraje y leche por metales pesados.

Debido a que Bilbao cuenta con una población pequeña se ejecutaron 43 encuestas a un representante de hogar, de las cuales, 22 se realizaron en el centro parroquial, 12 en Santa Cruz, 3 en Chontapamba, 3 en Motilones y 3 en Yuibug en las migas de limpieza de fin de semana que mantiene el GAD.

La encuesta constó de cuatro partes. La primera parte detallaba el objetivo de la encuesta; la segunda abarcó datos personales de los entrevistados tales como nombre, edad, habitantes por hogar y número celular, la tercera contenía un cuestionario de 15 preguntas de respuestas cerradas y semiabiertas, de estas doce preguntas cerradas contenían de 3 a 4 alternativas, y tres preguntas semiabiertas permitían al entrevistado escribir la respuesta y explicarla, este apartado contenía preguntas sobre las actividades agrícolas y ganaderas a las que se dedica la población, tipos de plaguicidas que utiliza, frecuencia y otras actividades pecuarias que realiza; y la cuarta parte presentaba el consentimiento informado de la persona encuestada.



**Figura 1-2.** Encuestas realizadas a moradores de la parroquia Bilbao.

**Realizado por:** Albán, T.; Ruiz, S. 2021.

### *2.2.1.2. Análisis y organización de datos*

Las encuestas fueron clasificadas por comunidades, de cada comunidad se contaron las respuestas de cada pregunta, se cuantificaron, tabularon e ilustraron porcentualmente en gráficos de barras para luego obtener un resumen general de los datos recolectados de toda la parroquia. Se realizó un análisis comparativo para clasificar cada respuesta ante una pregunta cerrada y determinar las principales tendencias que crearon las preguntas semiabiertas y así poder delimitar la información obtenida. Todas las respuestas de la encuesta fueron denominadas como universo y cada ítem de las preguntas como unidad de análisis. Por último, se sintetizó y analizó la información obtenida para establecer conclusiones y poder establecer el plan de muestreo.

### *2.2.2. Diseño experimental de muestreo*

Para evaluar la incidencia de los metales pesados (MP) de fuente volcánica en la cadena alimentaria, se muestrearon tres matrices (suelo, forraje y leche) en 7 sitios ubicados en las diferentes comunidades de la parroquia Bilbao, zona afectada por la caída de ceniza del volcán Tungurahua, según el informe del Instituto Geofísico Nacional publicado en 2017 “Reporte de erupción, volcán Tungurahua, 2016-01”. Las muestras se analizaron mediante el método de investigación mixta, ya que los resultados obtenidos fueron cualitativos y cuantitativos.

En el suelo por ser considerado como el medio de adsorción, almacenamiento y transformación de contaminantes (Rodríguez et al., 2019: pp.40-41), se determinó las siguientes variables; potencial de hidrogeno (pH), conductividad eléctrica (CE), contenido de materia orgánica (MO), textura,

densidad, metales pesados (MP) tales como plomo (Pb), cadmio (Cd), selenio (Se), arsénico (As), y mercurio (Hg), relación carbono/nitrógeno, fósforo y potasio.

En la parte aérea del forraje (tallo-hojas) se determinó pH, CE, MO, aniones (sulfatos, fosfatos, nitratos y cloruros), sodio, potasio, fósforo, relación carbono/nitrógeno y MP, ya que es la parte comestible del ganado vacuno además de ser el medio de transporte de los contaminantes; a nivel de la raíz se determinó MP por ser el órgano de absorción (Castro et al., 2018: p.472).

En la leche se evaluó la calidad fisicoquímica mediante la aplicación de la norma técnica ecuatoriana NTE INEN:9 LECHE CRUDA REQUISITOS así como la cuantificación de MP, dado que es uno de los alimentos más consumido por los pobladores y uno de los medios de excreción de metales pesados.

El análisis de MP se realizó por espectroscopia de absorción atómica (EAA) ya que es un método selectivo, rápido y con un grado de sensibilidad y precisión aceptable (Martínez, 2020, pp.8-9).

Con la concentración de metales pesados de las diferentes matrices se evaluó tres factores. El de bioacumulación (BCF), para medir la capacidad de captación de cada metal en el forraje (raíz) con relación a la concentración en el suelo. El de translocación (TF) permitió estimar la capacidad de absorción de MP en los órganos vegetativos a partir de la raíz y el de biotransferencia (BTF) dio a conocer la transferencia de MP de la planta a la leche (Usman et al., 2019: p.3).

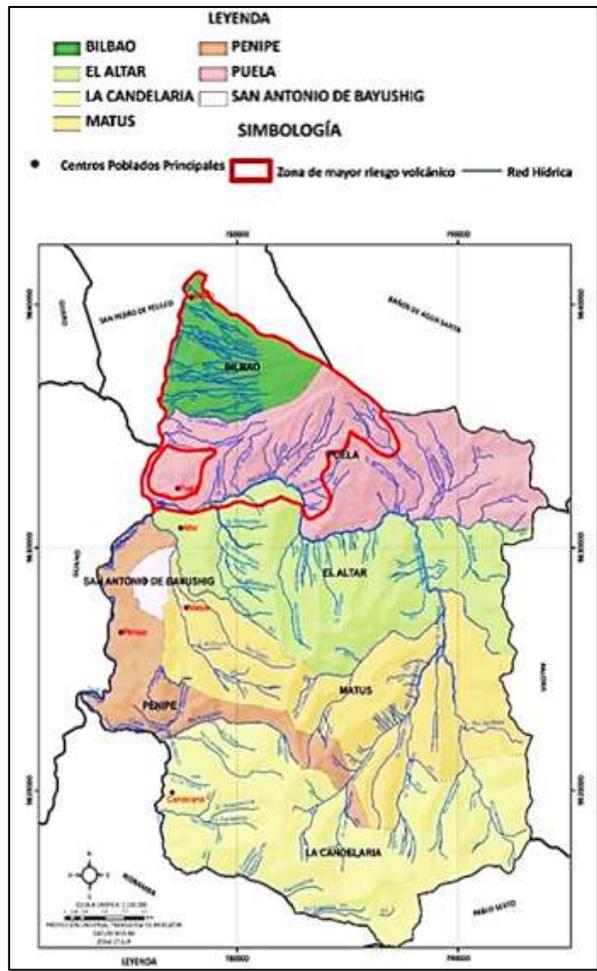
A nivel de la población el estudio se enfocó en la evaluación del riesgo para la salud mediante la estimación del coeficiente de peligro objetivo (THQ), índice de peligro (HI) e ingesta diaria estimada (EDI) (Meshref et al., 2014: p.382), lo que permitió conocer si el consumo de la leche es seguro para la población con respecto a la presencia de metales pesados.

### ***2.2.3. Localización del lugar de estudio***

#### **Descripción geográfica**

Bilbao es una parroquia ubicada al norte del cantón Penipe, está situada en las faldas del volcán Tungurahua en el valle interandino del río Chambo. Tiene como límites la provincia de Tungurahua, al norte; la parroquia Puela, al sur; el volcán Tungurahua, al este; y el Río Chambo al oeste. Está conformado por cuatro comunidades: Santa Cruz, Motilones, Chontapamba, Yuibug y el centro parroquial (GADPB, 2012).

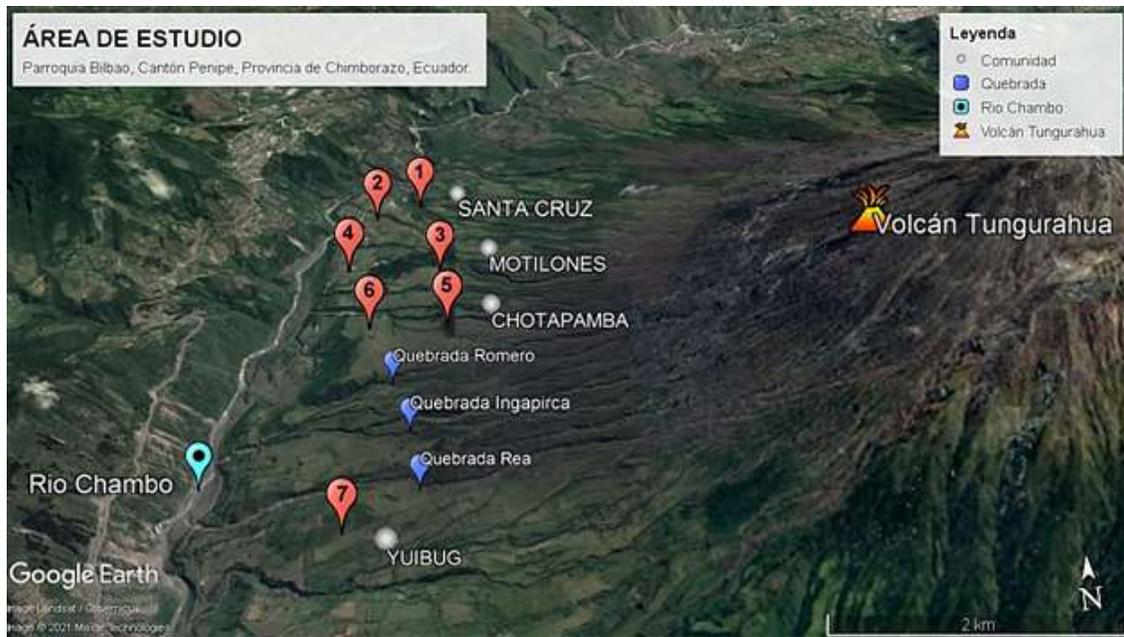
La parroquia Bilbao se encuentra ubicada en la zona 17, hemisferio Sur, cuyas coordenadas geográficas son -1.4432906,-78.5011472.



**Figura 2-2.** Mapa geográfico del cantón Penipe y ubicación de la parroquia Bilbao.

Fuente: GADPB, 2012.

Para localizar los 7 puntos de muestreo de la zona ganadera afectada por los periodos eruptivos del volcán Tungurahua se recorrió tanto la zona alta como baja de la parroquia con la ayuda de un representante del GAD. Con la ayuda de la aplicación de Google Maps se armó un mapa de ubicación geográfica de cada punto de muestreo determinado en las encuestas a lo largo de las diferentes quebradas donde se ubican las comunidades de la parroquia.



**Figura 3-2.** Mapa Geográfico de los sitios de muestreo de suelo, forraje y leche de la Parroquia Bilbao, Penipe.

**Realizado por:** Albán, T.; Ruiz, S. 2021.



**Figura 4-2.** Localización de los sitios de muestreo de suelo, forraje y leche de la Parroquia Bilbao, Penipe.

**Realizado por:** Albán, T.; Ruiz, S. 2021.

De esta manera en cada área seleccionada se tomaron muestras de suelo y forraje por el método zigzag y de leche mediante la aplicación de la NTE INEN 4. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS MUESTREO.

Las muestras de suelo y forraje se tomaron en el mes de febrero, mientras que las de leche en el mes de abril. Los análisis se realizaron en el laboratorio de Impactos Ambientales del Grupo de Investigación GAIBAQ, Laboratorio de Investigación ICEBBAF, Laboratorio de Calidad del Agua y Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), ubicada en la Panamericana Sur kilómetro 1 1/2 del cantón Riobamba,, provincia de Chimborazo.

#### **2.2.4. Método de muestreo**

El método de muestreo empleado en esta investigación fue el probabilístico aleatorio simple, donde se tomó 7 puntos equidistantes que abarcaron toda la zona ganadera productora de leche de la parroquia Bilbao. Para garantizar la cobertura total de cada punto a muestrear se realizó un muestreo sistemático de la siguiente manera.

Se delimitó el área a muestrear con ayuda de estacas y una piola, luego aplicando el método tipo zig-zag se estableció distancias uniformes, en puntos equidistantes para abarcar toda el área del terreno. Con guantes de protección se procedió a tomar 10 sub-muestras de suelo a una profundidad de 40 a 50 cm con ayuda de un barreno para tener una muestra compuesta de 2 Kg, se colocó en una funda ziploc, se etiquetó con su respectivo código y se homogenizó en la misma bolsa. El muestreo se realizó por duplicado.



**Figura 5-2.** Delimitación del área de muestreo, recolección de las muestras y determinación de temperatura y humedad con el termohigrómetro.

**Realizado por:** Albán, T.; Ruiz, S. 2021.

Para registrar la humedad y temperatura se colocó el termohigrómetro portátil en un punto fijo del terreno por 15 minutos; y el GPS para ubicar las coordenadas de altitud y latitud. Los datos obtenidos se registraron en una ficha de muestreo.

Las muestras de suelo se llevaron al laboratorio para ser secadas al aire libre en bandejas de aluminio hasta un porcentaje de humedad constante.



**Figura 6-2.** Secado de muestras de suelo a temperatura ambiente.

**Realizado por:** Albán, T.; Ruiz, S. 2021.

Las muestras vegetales fueron tomadas en los mismos puntos donde se tomaron las muestras de suelos en una cantidad de 2kg, arrancando cuidadosamente toda la raíz para evitar que se rompa.

Las muestras de leche se recogieron en la mañana y tarde, horarios donde se realiza el ordeño del ganado vacuno que se alimenta en los terrenos anteriormente muestreados, para esto se procedió de la siguiente manera: se mezcló el contenido que se encontraba en los bidones de leche, se tomó 300 mL de muestra en envases de plástico estériles previamente codificados, posteriormente las muestras se almacenaron en un cooler rodeadas de hielo y se transportaron al laboratorio para su almacenamiento en refrigeración y posterior análisis.



**Figura 7-2.** Toma de muestra de leche y almacenamiento en un cooler.

**Realizado por:** Albán, T.; Ruiz, S. 2021

Finalmente, los datos necesarios para evaluar los riesgos para la salud de los habitantes de la parroquia fueron recogidos mediante la aplicación de encuestas y la toma de peso con una balanza. Las características de las tres matrices muestreados se registraron en la misma ficha donde se registró la humedad, temperatura, latitud y altitud de cada punto de muestreo.

#### **2.2.5. Preparación de las muestras**

Los forrajes se transportaron al laboratorio, se lavaron con agua destilada, se secaron hasta peso constante a 60°C en una estufa de aire forzado, se separaron las partes áreas de las raíces y para obtener un tamaño de partícula menor a 5 cm se molieron en un molino eléctrico acoplado a una malla de 50 mm de diámetro. Ambos tipos de muestras se almacenaron en bolsas ziploc debidamente codificadas para los análisis posteriores.



**Figura 8-2.** Toma de muestra de forraje, lavado y almacenamiento en fundas ziploc.

**Realizado por:** Albán, T.; Ruiz, S. 2021.

Se colocó  $\frac{3}{4}$  partes de las muestras trituradas (parte aérea y raíces) en vasos de precipitación de 600 ml previamente etiquetados. Se secaron en la estufa a 105°C por 24 horas, pues los resultados se reportan sobre muestra seca. Posteriormente se pasaron al desecador por 30 min. Hasta que se enfríen, se almacenaron en frascos de plástico estériles debidamente etiquetados y se volvieron a almacenar en el desecador para evitar que adquieran humedad.



**Figura 9-2.** Secado de muestras vegetales y almacenamiento en frascos estériles en el desecador.

**Realizado por:** Albán, T.; Ruiz, S. 2021.

Por otro lado, las muestras de suelo secadas al aire fueron tamizadas a la luz de una malla de 2mm para eliminar piedras y cascajos, y así obtener muestras homogéneas con un tamaño de partícula más fino. Una vez tamizadas se procedió de la misma manera que las muestras de forraje.



**Figura 10-2.** Tamizado de las muestras secas de suelo.

**Realizado por:** Albán, T.; Ruiz, S. 2021.

En cuanto a las muestras de leche, por el corto tiempo de vida útil que presentan se conservaron en refrigeración, posteriormente se realizaron los análisis que se detallan en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 9:2012. Para el uso del equipo LACTOSCAN, las muestras fueron filtradas en un tamiz de plástico para retirar cualquier tipo de contaminante, llevadas a una temperatura aproximada de 20 °C y homogenizadas para su posterior análisis.

Una vez preparadas las muestras de suelo forraje y leche, se realizaron los diferentes análisis por triplicado para garantizar la fiabilidad de los resultados.

## **2.2.6. Análisis físico químico del suelo**

### **2.2.6.1. Determinación de la densidad real**

Se pesó el matraz de aforo de 50 ml vació previamente tarado y codificado (P1), luego con ayuda de un embudo pequeño se añadió 10 g de muestra seca al aire y se registró el peso del matraz más la muestra (P2), seguidamente se añadió agua destilada hasta la mitad de su capacidad lavando el suelo que haya quedado en el cuello del balón y se agitó por 5 minutos para eliminar el aire retenido en la muestra, a continuación se aforo el balón con agua destilada, se dejó reposar por 30 minutos a fin de asegurar la usencia de burbujas de aire que puedan afectar la medición, y se pesó (P3), finalmente se lavó el matraz y se registró el último peso aforando el balón con agua destilada (P4) . Para calcular la densidad real se aplicó la siguiente fórmula (Andrades et al., 2015: pp.35-36):

$$Dr \left( \frac{g}{ml} \right) = \frac{P2 - P1}{(P4 - P1) - (P3 - P2)}$$



**Figura 11-2.** Determinación de densidad real.

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### 2.2.6.2. Determinación de la densidad aparente

Se pesó 30 g de muestra seca y con la ayuda de un embudo pequeño se colocó lentamente en una probeta de 50 ml, posteriormente en una superficie plana se midió el volumen que ocupa la muestra. Para calcular la densidad aparente se aplicó la siguiente fórmula (Andares et al., 2015: pp.35-36):

$$Da \text{ (g/ml)} = \text{Peso del suelo seco} / \text{volumen de suelo que ocupa en la probeta}$$



**Figura 12-2.** Determinación de densidad aparente

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### 2.2.6.3. Determinación de la textura

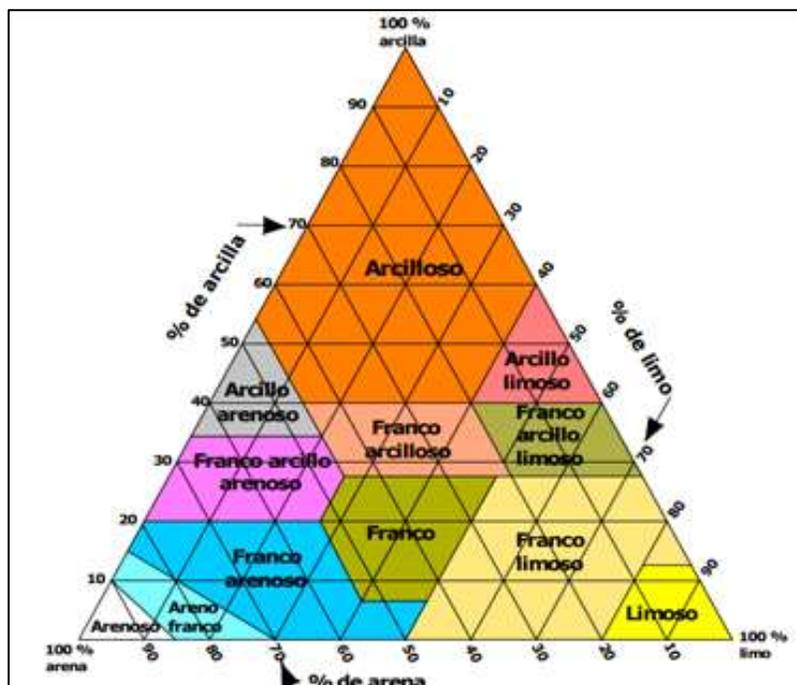
Se pesó 100 g de suelo seco y tamizado en un vaso de plástico grande previamente codificado, se agregó 10 ml del agente dispersante (solución de 20g de carbonato de sodio, 75 g de hexametáfosfato de sodio en 1,62 L de agua destilada), seguidamente se añadió 200 ml de agua destilada, se mezcló con una varilla de agitación por un minuto y se dejó reposar por 24 horas. Posteriormente todo el contenido se trasvasó a una probeta de 1000 ml lavando la superficie y paredes del vaso con chorros de agua destiladas para que no queden retenidas las partículas de suelo en el recipiente, posteriormente se aforo a 1000 mL, luego con ayuda de la palma de la mano se tapó la boca de la probeta y se agito vigorosamente la suspensión por un minuto, se colocó en un superficie plana y la misma vez que se sumergió el hidrómetro se corrió el cronómetro por 40 segundos para luego efectuar la primera lectura, posterior a ello se tomó la temperatura de la muestra y se registró el dato; para efectuar la segunda lectura, se dejó reposar la muestra por 2 horas

y se sumergió nuevamente el hidrómetro y termómetro por 40 segundos. La textura se determinó haciendo uso del triángulo de textura (Gráfico 13-2) con los % de arena, limo y arcilla calculado. Las fórmulas aplicadas fueron las siguientes (Gupta et al., 2012: pp.42-48):

$$\% \text{ Arena (0,05 - 2,00 mm)} = 100 - ((\text{Primera lectura} / \text{g de muestra}) * 100)$$

$$\% \text{ Arcilla (<0,002 mm)} = (\text{Segunda lectura} / \text{g de muestra}) * 100$$

$$\% \text{ Limo (0,002 - 0,05 mm)} = 100 - (\% \text{ arena} + \% \text{ arcilla})$$



**Figura 13-2.** Triángulo de textura del USDA

Fuente: USDA, 1999.



**Figura 14-2.** Determinación de textura

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

#### 2.2.6.4. Determinación del pH

Para la determinación de pH se pesó 20 g de suelo seco en vasos plásticos, se adicionó 50 ml de agua destilada (proporción 2:5), se agitó la solución durante dos minutos y se dejó reposar 30 minutos. Transcurrido el tiempo se midió el pH en el líquido sobrenadante y se anotó el valor obtenido; previamente a las mediciones de pH el equipo se calibró con las soluciones buffer de pH =4, pH =7 y pH =10. Entre las mediciones se limpió el electrodo y sensor de temperatura con agua destilada para evitar errores (Gupta et al., 2012: pp.29-32).

#### 2.2.6.5. Determinación de la conductividad eléctrica (CE)

La conductividad eléctrica se midió en un multiparámetro, el cual se calibró con una solución estándar de KCl 0,01N. Para esta determinación se pesó 20g de muestra en vasos plásticos, se adicionó 40 ml de agua destilada (proporción 1:2), luego de esto, se agitó la solución durante 5 minutos, se dejó reposar 30 minutos, después se agitó nuevamente durante 10 minutos y se midió la CE en la solución acuosa (Gupta et al., 2012: pp.29-30).



**Figura 15-2.** Medición de pH y CE en suelos

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

#### 2.2.6.6. Determinación de materia orgánica

El contenido de materia orgánica se determinó por el método de calcinación, para ello se codificó la base de los crisoles de 50 y 30 ml con lápiz grafito, se tararon a 105 °C por 2 horas y se pasaron al desecador por 30 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente, seguidamente se pesaron los crisoles y se registró el primer peso (P1), luego se añadió 5 g de muestra secada en estufa a 105°C por 24 horas, y se registró el segundo peso (P2), posteriormente las muestras fueron

llevadas a la mufla a 430 °C por un tiempo mayor o igual a 16 horas para lograr la oxidación de los compuestos orgánicos, se dejó enfriar la mufla y con la ayuda de una pinza se colocó las muestras en el desecador por 30 minutos, finalmente los crisoles fueron pesados para registrar el último peso (P3). Para calcular el % de MO se aplicó la siguiente fórmula (Andrades et al., 2015: pp.57-58):

$$\% \text{ MO} = P2 - P3 / P2$$



**Figura 16-2.** Determinación de materia orgánica

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

## **2.2.7. Análisis de macronutrientes en suelo**

### **2.2.7.1. Digestión de muestras de suelo para la medición fósforo (P) y potasio (K)**

Se pesó 0,5g de la muestra de suelo seco y se transfirió a un matraz de 125 mL, luego se añadió con cuidado 10 mL de  $H_2SO_4$  concentrado por las paredes del matraz, girándolo de tal manera que el ácido arrastre los restos de la muestra que pudieron quedar en las paredes del matraz. Se agitó hasta formar una mezcla uniforme y se dejó reposar por 10 minutos agitando en intervalos de 2 minutos. Se colocó un vidrio reloj sobre el matraz y este se calentó con ayuda de un reverbero luego se dejó en reflujo hasta que el contenido del matraz tuvo una coloración amarillenta, posterior a esto se colocó 1 mL de peróxido de hidrógeno gota a gota por las paredes del matraz y se dejó nuevamente en reflujo hasta que el contenido se haga transparente. Se retiró de la fuente de calor y se dejó enfriar, posterior a esto se añadió con cuidado 40 mL de agua destilada por las paredes del matraz y se dejó enfriar. Luego, se añadió dos gotas de indicador de fenolftaleína y se agregó una solución de Na (OH) al 0,5 hasta la formación de un color ligeramente rosado que persistió por unos 30 segundos, con el objetivo de neutralizar la muestra. Por último, el contenido del matraz se transfirió

a un balón de 100 mL y se aforó, esta solución se conserva para realizar las determinaciones de P y K (Paneque et al., 2010: pp.65-66).

Cabe mencionar, que todo este procedimiento fue desarrollado en una campana de extracción de gases.



**Figura 17-2.** Digestión de suelos con  $H_2SO_4$

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

#### 2.2.7.2. Determinación de Fósforo (P)

Para la determinación de P se prepararon dos soluciones (A y B), en la solución A se disolvieron 6g de molibdato de amonio en 20 mL de agua destilada, se añadió 0,1455g de tartrato de antimonio y potasio y se agitó hasta disolver, después se añadió con cuidado 70 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, se dejó enfriar y diluyó con agua hasta 100 mL.

Para preparar la solución B se disolvió 13,2g de ácido ascórbico en agua y se aforó a un volumen de 100 mL. Estas dos soluciones deben ser conservadas en refrigeración y a partir de ellas se preparó la solución de trabajo, se tomó 17,5 mL de la solución A, se agregó 400 mL de agua destilada, se mezcló y por último se añadió 5mL de la solución B y se afora a un volumen de 500mL. Cabe mencionar que la solución de trabajo debe ser preparada diariamente.

Las mediciones de fósforo se realizaron en el espectrofotómetro UV-VIS, por tal motivo se realizó una curva de calibración, primero, se preparó una solución estándar con  $KPO_4H_2$  de 1000 ppm de P en un volumen de 500mL y a partir de esta se preparó un patrón de 20 ppm de P aforado a 50 mL, a partir de esta solución se prepararon los patrones para la curva de calibración con las siguientes concentraciones: 0,1; 0,4; 0,8; 1,2 y 2 ppm; se tomó 5mL de cada patrón y se agregó 5 mL de la solución de trabajo, se agitó y se dejó reposar de 15 a 20 minutos, se midió en el equipo a una

longitud de onda de 880 nm y se anotó la absorbancia para la construcción del gráfico (Paneque et al., 2010: pp.76).

Se tomó 5mL de las muestras digestadas y se agregó 5 mL de la solución de trabajo, transcurrido el tiempo de reacción se leyó las muestras en el espectrofotómetro y se anotó el resultado dado en mg/L.

#### *2.2.7.3. Determinación de Potasio (K)*

Primero se elaboró la curva de calibración para la medición de K en el fotómetro de llama, para lo cual se preparó una solución estándar de 10 meq/L de K utilizando como soluto KCl, a partir de esta solución se preparó patrones con concentraciones de 0; 0,05; 0,1; 0,15 y 2 meq/L. Se ajustó el fotómetro para la medición de K con agua destilada y con el patrón de 10 meq/L, después se leyeron cada uno los patrones de mayor a menor concentración y se anotaron cada una de las señales correspondientes para con esto elaborar la curva de calibración.

Se tomó las muestras digestadas y se llevó al fotómetro de llama para el análisis y se anotó la señal obtenida para realizar el cálculo de % K (Paneque et al., 2010: pp.79-82).

#### *2.2.7.4. Determinación de Carbono y Nitrógeno*

La determinación de macronutrientes (Carbono y Nitrógeno) tanto en suelo como en forraje se determinó en el ANALIZADOR ELEMENTAL DE COMBUSTIÓN DIRECTA marca EUROVECTOR EA3000 mediante la técnica establecida por el Laboratorio de Impactos y Protección Ambiental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, para ello las muestras se secaron en una estufa a 105°C por 24 horas y se tamizaron a la luz de una malla de 0,5 mm, posteriormente en una cápsula de estaño de 9 x 5 mm se pesaron entre 0,5 y 1,5 mg de muestra en un microbalanza marca METTLER TOLEDO MODELO WXT S3DU, posteriormente las muestras se encapsularon (doblaron y presionaron) y se depositaron en el muestreador automático del equipo. Los pesos de cada una de la muestra fueron registrados para luego introducirlos en el software.

La curva de calibración se realizó pesando y encapsulando 5 estándares (sustancia con composición definida) de sulfanilamida, los pesos de los estándares estuvieron comprendidos al igual que las muestras entre 0,5 y 1,5 mg. Una vez que se colocaron los estándares y las muestras en el equipo se procedió con el análisis. El equipo analiza cada muestra en un tiempo aproximado de 10 minutos y muestra el resultado de cada análisis como porcentaje de cada elemento contenidos en la muestra.



**Figura 18-2.** Determinación de Macronutrientes

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### ***2.2.8. Digestión ácida por el método de calcinación por vía húmeda para la determinación de metales pesados en suelo***

El proceso de digestión de muestras de suelo se realizó mediante la técnica establecida por el Laboratorio de Impactos y Protección Ambiental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

La digestión es un paso previo a la determinación de MP puesto que garantiza la destrucción o eliminación de la materia orgánica de las muestras de suelo, para ello se pesó 0,5000 g de suelo seco y tamizado, se colocó en un erlenmeyer de 100 mL debidamente codificado y se añadió 10 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado, se agitó suavemente la mezcla y se dejó reposar por 30 minutos, se tapó con un vidrio reloj pequeño, luego se colocó en un reverbero a una temperatura menor a 83 °C (temperatura baja), y se procedió a calentar de 3 – 4 horas, con este sistema cerrado se consiguió que se eliminara la MO. La digestión se dio por concluida cuando la muestra pasó de color café a transparente.



**Figura 19-2.** Digestión de muestras de suelo

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

Posteriormente se dejó enfriar el erlenmeyer y el contenido se enrasó con agua destilada en un balón de 50 mL, después la solución fue filtrada en un tubo falcón y almacenada en refrigeración para su posterior análisis por EAA de llama.



**Figura 20-2.** Almacenamiento de las muestras de suelo digestadas

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

## **2.2.9. Análisis fisicoquímico de muestras vegetales**

### **2.2.9.1. Determinación de pH**

Para la determinación de pH se pesó 3 g de muestra en un tubo falcon de 50 ml, se adicionó 30 ml de agua destilada (proporción 1:10), luego de esto, los tubos se colocaron en el agitador por 2 horas. Transcurrido el tiempo de agitación se dejó sedimentar y se midió el pH en el líquido sobrenadante. Previamente a las mediciones de pH el equipo se calibró con las soluciones buffer de pH =4, pH =7 y pH =10. Entre las mediciones se limpió el electrodo y sensor de temperatura con agua destilada para evitar errores (Gupta et al., 2012).

### **2.2.9.2. Determinación de conductividad eléctrica**

La conductividad eléctrica se midió en un multiparámetro, el cual se calibró con una solución estándar de KCl 0,01N. Para esta determinación se pesó 3 g de muestra en un tubo falcon de 50 ml, se adicionó 30 ml de agua destilada (proporción 1:10), luego de esto, los tubos se colocaron en el agitador por 2 horas. Transcurrido el tiempo de agitación, los tubos se centrifugaron por 4 minutos a 2000 RPM, se filtró las muestras y se midió la conductividad eléctrica en la solución acuosa (Gupta et al., 2012).



**Figura 21-2.** Determinación de pH y CE en muestras de forraje

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### 2.2.9.3. Determinación de materia orgánica (MO)

El método que se utilizó para la determinación de MO es la oxidación de carbono orgánico por calcinación. Primero, se etiquetó la base de los crisoles con lápiz carbón, seguido a esto, se taró los crisoles a 105 °C por 2 horas en la estufa de secado. Transcurrido este tiempo, los crisoles se pasaron a un desecador por 30 min., después se pesó el crisol vacío obteniendo así el peso 1 (P<sub>1</sub>); a continuación, se agregó 3 g de muestra seca y esto se anotó como P<sub>2</sub>.

Los crisoles se colocaron en la mufla por 24 horas a 430 °C, cumplido el tiempo de calcinación los crisoles se pasaron al desecador durante 30 minutos y, por último, se pesa y se anota como P<sub>3</sub> (Andrades et al., 2015: pp.57-58):

$$\%MO = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$$

Donde:

P<sub>1</sub>= Peso del crisol tarado

P<sub>2</sub>= Peso del crisol + muestra seca

P<sub>3</sub>= Peso del crisol + muestra calcinada



**Figura 22-2.** Determinación de MO  
en muestras de forraje

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### ***2.2.10. Análisis de nutrientes de muestras vegetales***

#### ***2.2.10.1. Determinación de aniones***

La determinación de aniones se realizó mediante la técnica establecida por el Laboratorio de Calidad del Agua de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

Para la determinación de fosfatos, nitratos, sulfatos y cloruros se realizó un extracto con agua destilada de los aniones libres del tejido vegetal. Primero, se pesó 2,5 g de muestra vegetal seca y molida, se transfirió a un vaso de precipitación y se agregaron 50 mL de agua destilada. Se agitó a temperatura ambiente con ayuda de una varilla de vidrio y se dejó reposar toda la noche. Transcurrido el tiempo de reposo se filtró y se realizó una dilución 1:100 (dilución inicial) con el filtrado obtenido y agua. El equipo utilizado para la medición de fosfatos, nitratos y sulfatos fue el espectrofotómetro visible HACH DR 2800. Las diluciones obtenidas se agrupan de acuerdo a su coloración para evitar errores en las mediciones debido a que el método utilizado es colorimétrico.



**Figura 23-2.** Preparación de muestras vegetales para la determinación de aniones

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### **A. Fosfatos**

Para la medición de fosfatos se seleccionó el test 490 Preact. en el espectrofotómetro visible HACH; a continuación, se midió el blanco para cada uno de los grupos de muestras, para lo cual se llenó una cubeta de vidrio hasta la marca de 10 mL con una de las diluciones iniciales de cada grupo, se limpió bien el exterior de la cubeta y se colocó en el soporte portacubetas con la marca de llenado hacia el frente y se seleccionó en la pantalla “cero”, dando como resultado la lectura de 0,00 mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  (Hach Lange GmbH, 2019, p.1).

Para la preparación de la muestra, en tubos de 10 mL se realizó una dilución 1:10 con la dilución inicial de la muestra y agua, respectivamente, luego se adicionó el reactivo PhosVer en polvo y se agitó. Después de la agitación la muestra tomó una coloración azul ante la presencia de fosfatos y se dejó reposar durante dos minutos. Luego se llenó la cubeta con la muestra preparada del tubo, se limpió y se colocó en el soporte, a continuación, se seleccionó en la pantalla “medición” y el resultado obtenido apareció en mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  (Hach Lange GmbH, 2019, p.1).

### **B. Nitratos**

En el espectrofotómetro visible HACH DR 2800, se seleccionó el test 355 N Nitrato RA PP, para la medición del blanco se siguió el mismo procedimiento utilizado en fosfatos, dando como resultado una lectura de 0,00 mg/L  $\text{NO}_3^-$ .

En los tubos se colocó 10 ml de la dilución inicial de cada una de las muestras, se adicionó el reactivo NitraVer en polvo, seguido a esto se agitó y las muestras tomaron un color ámbar ante la presencia de nitratos y se dejó reposar durante cinco minutos. Se llenó la cubeta con la muestra preparada del tubo, se limpió y se colocó en el soporte, a continuación, se seleccionó en la pantalla “medición” y el resultado obtenido apareció en mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Hach Lange GmbH, 2019, pp.1-2).

### C. Sulfatos

En el espectrofotómetro HACH se selecciona el test 685 Sulfato AV y seguido a esto se mide el blanco dando una lectura de 0,00 mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. En los tubos se colocó 10 ml de la dilución inicial de cada una de las muestras y en uno se colocó 10 mL de agua destilada, a cada tubo se le añadió 200 µl de ácido sulfúrico de 1000 ppm, luego se adicionó el reactivo SulfaVer en polvo, se agitó y se formó turbiedad en las muestras ante la presencia de sulfatos y se dejó reposar durante cinco minutos. Se llenó la cubeta con la muestra preparada del tubo, se limpió y se colocó en el soporte, a continuación, se seleccionó en la pantalla “medición” y el resultado obtenido apareció en mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Al resultado de cada muestra se le resta el valor dado al medir el agua más el ácido sulfúrico (Hach Lange GmbH, 2019, pp.1-2).



**Figura 24-2.** Medición de aniones en el espectrofotómetro visible HACH DR 2800

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

## D. Cloruros

Para la determinación de cloruros se utilizó el método argentométrico de Mohr, para lo cual se midió la concentración de cloruros en el blanco, se colocó 100 mL de agua destilada a un matraz donde se colocó 1 mL de solución indicadora de cromato de potasio 5% y se tituló con la solución de  $\text{AgNO}_3$  0,01N hasta la formación de un color ladrillo. A continuación, se transfirió los 100 mL de la disolución inicial de las muestras a un matraz, se colocó 1 mL de solución indicadora y se tituló con la solución de  $\text{AgNO}_3$  hasta la formación de un color ladrillo. Para el cálculo de las concentraciones de cloruros se utilizó la siguiente fórmula (Lenore et al., 2000: pp.77-78):

$$\text{mgCl}^- / \text{L} = \frac{(A - B) \times N \times 35,45}{\text{mL muestra}} \times 1000$$

Donde:

A= mL valoración para la muestra

B= mL valoración para el blanco

N= normalidad de  $\text{AgNO}_3$



**Figura 25-2.** Medición de cloruros por el método argentométrico

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### 2.2.10.2. *Digestión de muestras vegetales para la medición de Na, K y P*

Se pesó 0,5g de la muestra vegetal seca y se transfirió a un matraz de 125 mL, luego se añadió con cuidado 12 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  *concentrado* por las paredes del matraz, girándolo de tal manera que el ácido arrastre los restos de la muestra que pudieron quedar en las paredes del matraz, a

continuación, se agregó 0,18 g de  $CuSO_4$  el cual actúa como catalizador. Se agitó hasta formar una mezcla uniforme y se dejó reposar por 10 minutos agitando en intervalos de 2 minutos.

Se colocó un vidrio reloj sobre el matraz y este se calentó con ayuda de un reverbero y se dejó en reflujo hasta que el contenido tuvo una coloración trasparente o blanquecina. Se retiró de la fuente de calor y se dejó enfriar, posterior a esto se añadió con cuidado 50 mL de agua destilada por las paredes del matraz y se dejó enfriar. Por último, el contenido del matraz se transfirió a un balón de 100 mL y se aforó, esta solución se conserva para realizar las determinaciones de Na, K y P (Paneque et al., 2010: pp.65-66).

Cabe mencionar, que todo este procedimiento fue desarrollado en una campana de extracción de gases.



**Figura 26-2.** Digestión de muestras de forraje

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### 2.2.10.3. *Determinación de Sodio (Na) en forraje*

El equipo que se utilizó para la medición de sodio es el fotómetro de llama, primero se elaboró la curva de calibración, para lo cual se preparó una solución estándar de 175 meq/L de Na utilizando como soluto NaCl, a partir de esta solución se preparó patrones con concentraciones de 0; 21,88; 43,75; 87,5 y 175 meq/L. Se ajustó el fotómetro para la medición de Na con agua destilada y con el patrón de 175 meq/L, después se leyeron cada uno los patrones de mayor a menor concentración y se anotaron cada una de las señales correspondientes para con esto elaborar la curva de calibración.

Se tomó las muestras digestadas y se llevó al fotómetro de llama para el análisis y se anotó la señal obtenida para realizar el cálculo de % Na (Paneque et al., 2010).

#### 2.2.10.4. *Determinación de Potasio (K) en forraje*

Primero se elaboró la curva de calibración para la medición de K en el fotómetro de llama, para lo cual se preparó una solución estándar de 10 meq/L de K utilizando como soluto KCl, a partir de esta solución se preparó patrones con concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2,5 meq/L. Se ajustó el fotómetro para la medición de K con agua destilada y con el patrón de 10 meq/L, después se leyeron cada uno los patrones de mayor a menor concentración y se anotaron cada una de las señales correspondientes para con esto elaborar la curva de calibración.

Se tomó las muestras digestadas y se llevó al fotómetro de llama para el análisis y se anotó la señal obtenida para realizar el cálculo de % K (Paneque et al., 2010: pp.80-83).



**Figura 27-2.** Medición de Na y K en el fotómetro de llama

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

#### 2.2.10.5. *Determinación de Fósforo (P) en forraje*

Para la determinación de P se prepararon dos soluciones (A y B), en la solución A se disolvieron 6g de molibdato de amonio en 20 mL de agua destilada, se añadió 0,1455g de tartrato de antimonio y

potasio y se agitó hasta disolver, después se añadió con cuidado 70 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, se dejó enfriar y diluyó con agua hasta 100 mL.

Para preparar la solución B se disolvió 13,2g de ácido ascórbico en agua y se aforó a un volumen de 100 mL. Estas dos soluciones deben ser conservadas en refrigeración y a partir de ellas se preparó la solución de trabajo, se tomó 17,5 mL de la solución A, se agregó 400 mL de agua destilada, se mezcló y por último se añadió 5mL de la solución B y se afora a un volumen de 500mL. Cabe mencionar que la solución de trabajo debe ser preparada diariamente.

Las mediciones de fósforo se realizaron en el espectrofotómetro UV-VIS, por tal motivo se realizó una curva de calibración, se preparó una solución estándar con  $KPO_4H_2$  de 50 ppm de P y a partir de esta se preparan patrones con las siguientes concentraciones: 0.2, 0.4, 0.5, 1 y 1.5 ppm; se tomó 5mL de cada patrón y se agregó 5 mL de la solución de trabajo, se agitó y se dejó reposar de 15 a 20 minutos, se midió en el equipo y se anotó la absorbancia para construcción del gráfico.

Se tomó 5 mL de la muestra preparada y se añadió 5 mL de la solución de trabajo, transcurrido el tiempo de reacción se leyó las muestras en el espectrofotómetro y se anotó el resultado dado en mg/L (Paneque et al., 2010: p.76).



**Figura 28-2.** Medición de P en el espectrofotómetro UV-VIS

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### ***2.2.11. Digestión de muestras vegetales para la determinación de metales pesados***

El proceso de digestión de muestras vegetales se realizó mediante la técnica establecida por el Laboratorio de Impactos y Protección Ambiental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

La digestión es un paso previo a la determinación de MP puesto que garantiza la destrucción o eliminación de la materia orgánica de las muestras de forraje, para esto se pesó 0,5000 g de materia vegetal, se colocó en un erlenmeyer de 100ml previamente codificado y se añadió 6 ml de la mezcla de  $\text{HNO}_3$  y  $\text{HClO}_4$  en proporción 2:1, se agitó suavemente y se dejó reposar por 24 horas, pasado este tiempo la muestra se tapó con un vidrio reloj pequeño, luego se colocó en un reverbero para calentar el contenido del Erlenmeyer y así se dé un proceso de reflujo, al cabo de 2 horas de digestión se colocó gota a gota 2 ml de peróxido de hidrógeno para acelerar la reacción, el aumento de la temperatura fue progresivo hasta visualizar que la muestra se torne transparente y los humos que se desprendan de la digestión sean blanquecinos, el proceso duro de 5-6 horas. Se dejó enfriar el erlenmeyer, se trasvaso a un balón de 50 ml y se aforó con una solución 0,5 M de HCl, luego el contenido fue filtrado en un tubo falcón y almacenado en refrigeración para su posterior análisis.



**Figura 29-2.** Digestión de muestras vegetales.

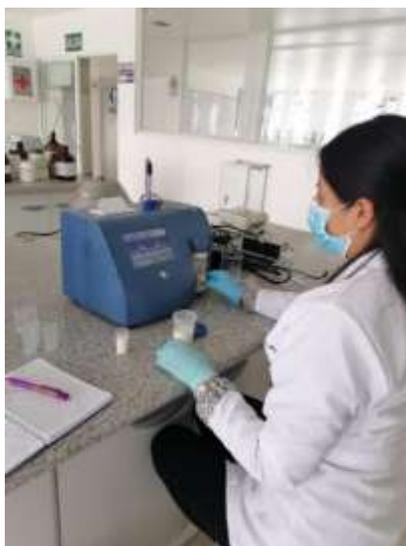
**Realizado por:** Ruiz, S; Albán, T. 2021.

## ***2.2.12. Análisis fisicoquímico de la leche***

### ***2.2.12.1. Análisis en el equipo Lactoscan***

El lactoscan es un equipo que mediante su tecnología de ultrasonidos mide simultáneamente varios parámetros fisicoquímicos de la leche tales como el porcentaje de grasa, SNG, lactosa, sólidos totales, proteína, sales, adición de agua, densidad, punto de congelación, pH y conductividad

eléctrica. Para el análisis de estos parámetros la muestra de leche fue filtrada por un tamiz de plástico, luego se calentó en un reverbero para homogenizar la grasa y se llenó las  $\frac{3}{4}$  partes del vaso de plástico, posteriormente se colocó en la percha del equipo para la succión de la muestra y se seleccionó la opción vaca (opción para el análisis de leche cruda), al cabo de 60 segundos el resultado fue impreso y presentado en la pantalla del equipo; luego de cada muestra analizada se limpió el equipo con agua destilada. La limpieza con ácidos (Lactodaily y Lactoweekly) se realizó al final del día, a media semana y al fin de semana de trabajo (Milkotmic Ltd., 2012, pp13-23).



**Figura 30-2.** Análisis en el equipo Lactoscan.

**Realizado por:** Ruiz, S; Albán, T. 2021.

#### 2.2.12.2. *Determinación de acidez titulable como ácido láctico*

Para esta determinación primero se lavó y se secó el matraz Erlenmeyer en una estufa a una temperatura de 103 °C durante 30 minutos; transcurrido este tiempo se dejó enfriar en un desecador y se pesó. La muestra de leche se llevó a una temperatura de 20°C y se homogenizó cuidadosamente, se colocó 20g de leche en el matraz, luego se añadió 40 mL de agua destilada y 2mL de solución indicadora de fenolftaleína. El contenido del matraz se tituló con una solución 0,1 N de NaOH hasta conseguir un color rosado que persistió durante 30 segundos; por último, se anotó el volumen de la solución de NaOH empleado para cada titulación. El porcentaje de acidez titulable como ácido láctico se calculó aplicando la siguiente fórmula (NTE INEN 13: 2012):

$$\% A = \left(0,090 \times \frac{V \times N}{m_1 - m_2}\right) \times 100$$

Donde:

**V**= Volumen de la sln de NaOH empleado en la titulación

**m1**= peso del Erlenmeyer vacío

**N**= Normalidad de la sln de NaOH

**m2**= peso del erlenmeyer con leche



**Figura 31-2.** Determinación de acidez titulable.

Realizado por: Ruiz, S; Albán, T. 2021.

### 2.2.12.3. *Determinación de cenizas*

Se secó el crisol en una estufa a 105 °C por 30 minutos, se dejó enfriar en el desecador y se pesó (m1), seguidamente se homogenizó la muestra invirtiendo de 3 a 4 veces el recipiente y se añadió 5 g de leche (m2), luego la muestra se colocó a baño maría a ebullición por 30 minutos, posteriormente se pasó a la estufa a 105 °C por 3 horas, luego se colocó la muestra cerca de la puerta de la mufla abierta y se mantuvo allí durante un minuto para evitar pérdidas por proyección de material, se introdujo en la mufla a 530 °C por 3 horas, se dejó enfriar en el desecador por 30 minutos y se pesó (m3). El porcentaje de cenizas se calculó de la siguiente manera (NTE INEN 14: 2012):

$$\% C = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$



**Figura 32-2.** Determinación de cenizas.

**Realizado por:** Ruiz, S; Albán, T. 2021.

#### 2.2.12.4. *Ensayo de reductasa*

Con la ayuda de una pipeta se tomó 10 mL de la muestra de leche y se transfirió a un tubo de ensayo, seguido a esto, se añadió 1 mL de la solución de azul de metileno, se tapó el tubo y se calentó en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  durante 5 minutos. Trascurrido el tiempo se homogenizó el contenido de cada tubo y se volvió a colocar en el baño de agua para su incubación, evitando que tenga contacto con luz. Se homogenizó los tubos cada media hora y se tomó el tiempo desde que se colocó para la incubación hasta que la muestra de leche quedó decolorada (NTE INEN 18: 2012).



**Figura 33-2.** Ensayo de reductasa.

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### 2.2.13. Análisis cualitativo de la leche

#### 2.2.13.1. Determinación de la estabilidad proteica

Se colocó 5 mL de la muestra de la leche en un tubo de ensayo y se añadió 5 mL de una solución acuosa de alcohol etílico al 75%, se tapó y se agitó para homogenizar el contenido, seguido a esto se observó el aspecto de la muestra, por ejemplo, si hay formación de coágulos de leche o precipitación (NTE INEN 1500: 2011).



**Figura 34-2.** Determinación de la estabilidad proteica.

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021

#### 2.2.13.2. Presencia de conservantes

- **Identificación de formaldehído**

Se tomó 5 mL de leche homogenizada en un tubo de ensayo, se añadió 1 mL de  $H_2SO_4$  diluido con agua en proporción 1:1 y por último se agregó 1 gota de cloruro férrico al 1%. Se agitó y se calentó a ebullición, se observó el aspecto de la muestra para reportar como positivo o negativo (NTE INEN 1500: 2011).



**Figura 35-2.** Identificación de formaldehído.

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

- **Identificación de peróxido de hidrógeno**

La identificación de peróxido de hidrógeno se la hizo a través del método del yoduro de potasio, para lo cual se tomó 5 mL de la muestra de leche, se añadió 5 gotas de la solución de yoduro de potasio al 35%, se homogenizó y observó la coloración de la leche, al no presentar cambio se reportó como negativo (NTE INEN 1500: 2011).



**Figura 36-2.** Identificación de peróxido de hidrógeno.

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

- **Identificación de cloro, hipocloritos, cloraminas y dióxido de cloro**

La identificación cloro, hipocloritos, cloraminas y dióxido de cloro se realizó a través del método del yoduro de potasio, para lo cual se preparó una solución de KI al 7,5 %. Se tomó 5 mL de la muestra de leche y se añadió 0,5 mL de la solución de KI, se agitó y se observó la coloración. Al no presentar cambio de color se añadió 4mL de ácido acético, se calentó en un baño de agua a 80 C° durante 10 minutos, por último, se enfrió y se observó la coloración; al no existir cambio se reportó como negativo (NTE INEN 1500: 2011).



**Figura 37-2.** Identificación de cloro, hipocloritos, cloraminas y dióxido de cloro.

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### 2.2.13.3. *Presencia de neutralizantes*

- **Método de la prueba de la alizarina**

Primero, se preparó una solución alcohólica de alizarina al 0,2% m/v (en alcohol al 75%), se mezclaron 2 mL de leche con 2mL de la solución de alizarina, se homogenizó y se observó el color. Al no presentar un color morado se reportó que las muestras no poseen neutralizantes (NTE INEN 1500: 2011).



**Figura 38-2.** Prueba de alizarina.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

- **Identificación de orina en la leche**

Para esta determinación se utilizó la prueba de pupo, para lo cual se colocó 5mL de leche en un tubo de ensayo, seguido a esto, se añadió 5mL de HCl, 5mL de etanol y 5 mL de HNO<sub>3</sub>, se homogenizó y al no existir la formación de un color rosado con fluorescencia azulada, se reportó como negativo (NTE INEN 1500: 2011).



**Figura 39-2.** Identificación de orina en leche.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

#### 2.2.13.4. *Presencia de adulterantes*

- **Detección de almidón**

Se colocó en un tubo de ensayo 10mL de leche y se calentó a ebullición durante 5 minutos, transcurrido el tiempo se enfrió y se colocó 5 gotas de la solución de lugol, se agitó y se observó la coloración, al no formarse un color azulado se reportó la prueba como negativa (NTE INEN 1500: 2011).



**Figura 40-2.** Detección de almidón.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

#### 2.2.14. *Digestión de muestras de leche para determinación de metales pesados*

Se pesó 5 gramos de la muestra de leche y se colocó en un matraz Erlenmeyer, seguido a esto se agregó 10 mL de  $HNO_3$  conc, se tapó con un vidrio reloj y se dejó en digestión a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido el tiempo, se agregó 20 mL de agua destilada, se tapó con un vidrio y se calentó a reflujo en un reverbero a  $100^{\circ}C$  hasta que el contenido del matraz se redujera a 10 mL. Se dejó enfriar y se añadió 10 mL de HCl concentrado y 10 mL de agua destilada, se calentó a reflujo hasta que el contenido se redujera nuevamente a 10 mL y la digestión se torne transparente. Por último, se aforó a 50 mL, se filtró y se almacenó en refrigeración (Castro et al., 2018: p.470).



**Figura 41-2.** Digestión de muestras de leche.

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### ***2.2.15. Determinación de metales pesados por Espectroscopia de Absorción Atómica de llama***

La determinación de metales pesados se realizó con las metodologías establecidas en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH. Los estándares utilizados en la medición fueron de MARCA SIGMA-ALDRICH.



**Figura 42-2.** Determinación de metales pesados por Espectroscopia de Absorción Atómica.

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

#### ***2.2.15.1. Determinación de Plomo y Cadmio***

A partir del estándar de plomo de 1000 ppm (mg/L) marca se preparó la solución madre de 40 ppm en un balón de aforo de 100 ml, posteriormente de esta solución se tomaron alícuotas de 1, 2, 3, 5 y 10 ml y se depositaron en balones de 100 ml para la preparar los estándares de 0,4; 0,8; 1,2; 2 y 4 ppm (mg/L) respectivamente.

A partir del estándar de cadmio de 1000 ppm (mg/L) se preparó la solución madre de 2 ppm en un balón de aforo de 100 ml, posteriormente de esta solución se tomaron alícuotas de 1, 2, 3, 5 y 10 ml y se depositaron en bales de 100 ml para la preparar los estándares de 0,02; 0,04; 0,06; 0,1 y 0,2 ppm (mg/L) respectivamente.

Los estándares de plomo y cadmio se prepararon en un mismo balón y se aforaron con una solución de ácido nítrico al 2%, para lo cual en cada balón primero se colocaron las alícuotas de plomo desde la de menor concentración hasta la de mayor concentración y luego de la misma forma las alícuotas de cadmio.

La medición de cada metal se realizó por separado. Para la medición de plomo primero se encendió el equipo de Absorción Atómica (AA) de llama Thermo SCIENTIFIC iCE 3000 AA05170304 v1, 30 junto con el ordenador, luego se colocó la lámpara de cátodo hueco de Plomo, se abrió la válvula de gases aire-acetileno y se estableció la longitud de onda de 217 nm, seguidamente se corrió el blanco de agua y los 5 estándares de menor a mayor concentración para establecer la curva de calibración con  $r^2$  mayor al 0,99. Posteriormente se corrieron el duplicado de las muestras digeridas de suelo, raíz, forraje y leche; cada 20-22 muestras que ingresaban al equipo se leía un estándar para garantizar la fiabilidad de las absorbancias.

La medición de cadmio se realizó de la misma manera, con la diferencia que en el equipo de AA se colocó la lámpara de cátodo hueco de cadmio y se estableció la longitud de onda de 228,8 nm.

#### 2.2.15.2. *Determinación de Mercurio*

A partir del estándar de mercurio de 1000 ppm (mg/L) o 1000 000 ppb (ug/L) se preparó la solución madre de 1000 ppb en un balón de aforo de 100 ml, posteriormente, de esta solución se tomaron alícuotas de 0,4; 1, 2, 3, y 4 ml y se depositaron en balones de 100 ml para preparar los estándares de 4, 10, 20, 30, 40 ppb respectivamente, luego se aforaron con una solución de ácido nítrico al 2%. Para el funcionamiento del generador de hidruros que se encontraba acoplado al equipo de Absorción Atómica se preparó una solución de borohidruro de sodio al 0,6 % en hidróxido de sodio al 0,5 % en un balón de 500 ml y una solución de ácido clorhídrico al 10 % en un volumen de 500 ml.

La medición de mercurio se realizó de la siguiente manera: se encendió el equipo de Absorción Atómica, se colocaron las soluciones antes mencionadas en el generador de hidruros, posteriormente se colocó la lámpara de cátodo hueco de mercurio, se abrió la válvula del gas argón y se estableció la longitud de onda de 253,7 nm, seguidamente se corrió el blanco de agua y los 5

estándares de menor a mayor concentración para establecer la curva de calibración con  $r^2$  mayor al 0,99. Posteriormente se corrió el duplicado de las muestras digeridas de suelo, raíz, forraje y leche; cada 20-22 muestras que ingresaban al equipo se leía un estándar para garantizar la fiabilidad de las absorbancias.

#### 2.2.15.3. *Determinación de Arsénico*

Para la determinación de arsénico se preparó una solución pre-reductora al 20 % de yoduro de potasio (KI) y ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ), para lo cual se disolvió 50g de KI y  $C_6H_8O_6$  en agua destilada, luego se aforó a 250 mL.

A partir del estándar de arsénico de 999 ppm (mg/L) o 999 000 ppb (ug/L) se preparó la solución madre de 300 ppb, a esta solución se añadió 10 mL de la solución pre-reductora y se aforó a 1000 mL, posteriormente, de esta solución se tomaron alícuotas de 1; 1,67; 3,33; 6,67 y 8,83 mL, se depositaron en balones para preparar los estándares de 3, 5, 10, 20 y 25 ppb respectivamente, por último, se añadió 10 mL de HCl concentrado y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Para la preparación de las muestras, se tomó 16 mL de cada una y se colocaron en tubos falcon previamente codificados, a continuación, se añadió 2 mL de HCl y 2 mL de la solución pre-reductora, se homogenizó el contenido y se dejó reposar durante una hora.

Para el funcionamiento del generador de hidruros se preparó una solución de borohidruro de sodio al 0,7 % en hidróxido de sodio al 0,5 % en un balón de 500 ml y una solución de ácido clorhídrico al 50 % en un volumen de 500 ml. La medición de arsénico se realizó de la siguiente manera: se encendió el equipo de Absorción Atómica, se colocaron las soluciones antes mencionadas en el generador de hidruros, posteriormente se colocó la lámpara de cátodo hueco de arsénico, se abrió la válvula del gas de acetileno y se estableció la longitud de onda de 193,7 nm; seguidamente se corrió el blanco de agua y los 5 estándares de menor a mayor concentración para establecer la curva de calibración con  $r^2$  mayor al 0,99. Posteriormente, se corrió el duplicado de las muestras digeridas de suelo, raíz, forraje y leche; cada 20-22 muestras que ingresaban al equipo se leía un estándar para garantizar la fiabilidad de las absorbancias.

#### 2.2.15.4. *Determinación de Selenio*

A partir del estándar de selenio de 1000 ppm (mg/L) o 1000 000 ppb (ug/L) se preparó la solución madre de 300 ppb en un balón de aforo de 1000 ml, a esta solución se añadió 10 mL de HCl y se

aforó con agua destilada. Posteriormente, de la solución madre se tomaron alícuotas de 2, 7 y 10 mL y se depositaron en balones de 50 ml para preparar los patrones de 12, 42 y 60 ppb respectivamente, a la vez se colocó 0,5 mL de HCl y se aforó con agua destilada.

Para preparar los estándares de 12, 42 y 60 ppb, se colocaron 5 ml de cada patrón y 5 mL de HCl, en balones de 25 mL, seguidamente se llevaron a baño maría a una temperatura de 90 °C por 30 minutos, se dejó enfriar y se aforo con agua destilada.

Para el funcionamiento del generador de hidruros se preparó una solución de borohidruro de sodio al 0,6 % en hidróxido de sodio al 0,5 % en un balón de 500 ml y una solución de ácido clorhídrico al 10 % en un volumen de 500 ml.

La medición de selenio se realizó de la siguiente manera: se encendió el equipo de Absorción Atómica, se colocaron las soluciones antes mencionadas en el generador de hidruros, posteriormente se colocó la lámpara de cátodo hueco de selenio, se abrió la válvula del gas acetileno y se estableció la longitud de onda de 196,0 nm, seguidamente se corrió el blanco de agua y los 3 estándares de menor a mayor concentración para establecer la curva de calibración con  $r^2$  mayor al 0,99. Posteriormente se corrió el duplicado de las muestras digeridas de suelo, raíz, forraje y leche; cada 20-22 muestras que ingresaban al equipo se leía un estándar para garantizar la fiabilidad de las absorbancias.

#### ***2.2.16. Factores de bioconcentración, translocación y biotransferencia***

Para cada metal pesado (Pb, Cd, Hg, As y Se) se calculó el factor de bioconcentración, translocación y biotransferencia. El factor de bioconcentración (BCF) se calculó dividiendo la concentración del metal en la raíz para la concentración del metal en el suelo, el factor de translocación (TF) se calculó dividiendo la concentración del metal en la parte comestible para la concentración del metal en la raíz, por último el factor de biotransferencia (BTF) se determinó dividiendo la concentración del metal en la leche para el consumo promedio diario del metal (mg/día), en este valor se consideró que una vaca al día consume un promedio de 10Kg de forraje (Castro et al., 2018, p.472).

#### ***2.2.17. Evaluación de los parámetros de riesgo para la salud***

El coeficiente de peligro objetivo (THQ), el índice de peligro (HI) y la ingesta diaria estimada (EDI) de los metales analizados (Pb, Cd, Hg, As y Se) se determinó en base a su concentración promedio y a los datos de consumo que se estimaron accediendo a la FAOSTAT (tabla 1-2). El

consumo per cápita de la leche según el Ministerio de Agricultura del Ecuador (2018) es de 110 L/persona/año, este valor de suministro de leche se dividió por los 365 días del año y el resultado se multiplicó por 1000 para la conversión a mL; por último, este valor obtenido se multiplicó por la densidad de la leche (1,03 g/ml) para la conversión a gramos (Antoine et al, 2017). El resultado es una ingesta de 309 g / cápita / día que es la tasa de ingestión ( $F_{IR}$ ) de leche en Ecuador.

Para calcular el EDI y el THQ es necesaria una dosis de referencia oral para cada uno de los metales, los cuales están establecidos en la EPA de los Estados Unidos “Revisión de los procesos de dosis de referencia y concentración de referencia”.

**Tabla 1-2:** Datos de consumo de leche.

Datos de consumo	Unidad	Valor
Frecuencia de exposición ( $E_{fr}$ )	días	365
Duración de la exposición (Ed)	años	70
Tasa de ingesta Diaria ( $F_{IR}$ )	g/día	309
Dosis de referencia oral (Rfd )	mg/kg día	0,001 Pb 0,002 Cd 0,0003 Hg 0,0003 As 0,005 Se
Peso corporal promedio ( $BW_a$ )	kg	70
Tiempo de exposición promedio ( $AT_n$ )	días	25500

**Fuente:** FAO STAT citado en Antoine et al, 2017.

Para el cálculo del THQ y EDI se remplazaron los datos de la tabla 1-2 en las siguientes fórmulas, donde C es la concentración promedio (ppm) de cada metal obtenido en la investigación.

$$THQ = \frac{E_{FR} \times E_a \times F_{IR} \times C}{Rfd \times BW_a \times AT_n} \times 10^{-3} \quad EDI = \frac{(C \times F_{IR})}{BW_a}$$

Para la obtención del valor del HI se sumó los THQ individuales de los elementos evaluados para la leche.

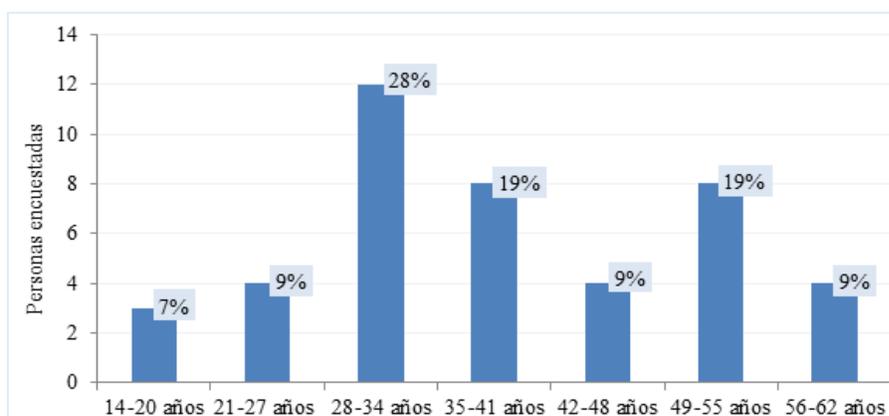
## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1. Análisis de encuestas

##### 3.1.1. Sección 1: Datos Personales

#### Edad



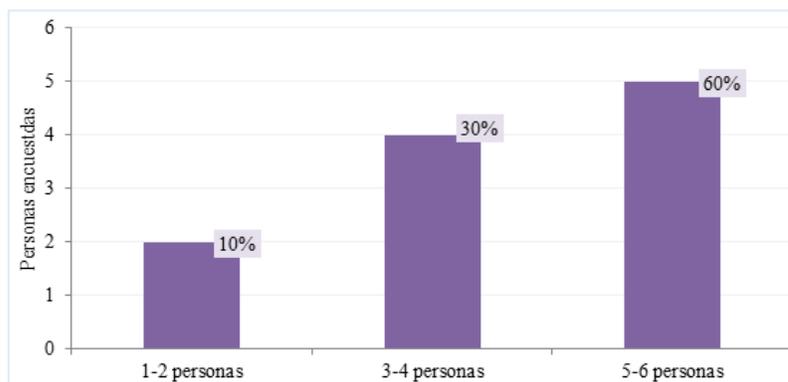
**Gráfico 1-3.** Edad de las personas encuestadas.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

#### Interpretación:

La encuesta denominada “Plan de muestreo” fue aplicada a 43 personas de la Parroquia Bilbao. El 28% de las personas encuestadas presentan una edad entre 28 y 34 años, el 19% presentan una edad de 35-41 años y de 49-55 años respectivamente. Un 9% comprende edades de 21-27 años, 42-48 años, y 56-62 años respectivamente, el 7% restante presenta una edad de 14-20 años. Esto indica que la mayor parte de la población encuestada presenta de 28-34 años.

## Habitantes por hogar



**Gráfico 2-3.** Habitantes por hogar de las personas encuestadas.

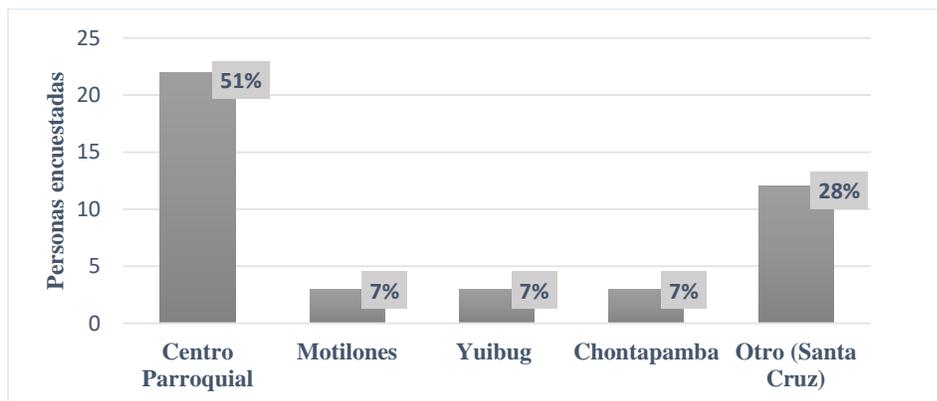
Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### Interpretación:

El 60% de las personas encuestadas manifiestan que los habitantes por hogar son de 5-6 personas, el 30 % expresan que los habitantes por hogar son de 3-4 personas y el 10 % restante expresa que los habitantes por hogar se encuentran de 1-2 personas. Esto indica que la parroquia Bilbao presenta mayoritariamente hogares con 5 o 6 miembros.

### 3.1.2. Sección 2: Desarrollo

#### Pregunta N°1: Indique en qué comunidad de la parroquia Bilbao vive usted.



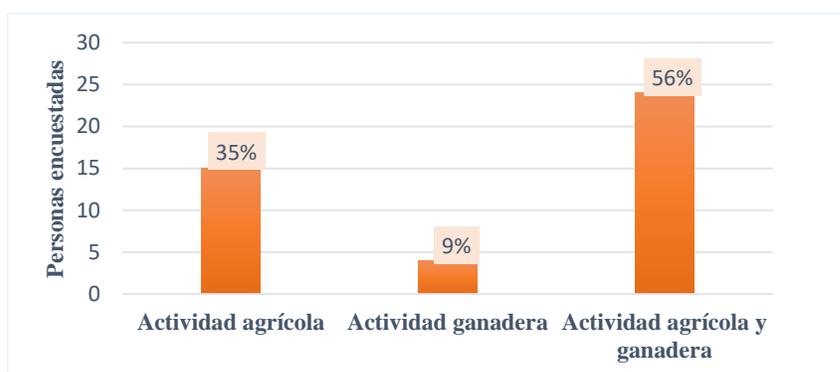
**Gráfico 3-3.** Comunidades de la parroquia Bilbao en las que viven las personas encuestadas.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### Interpretación:

El 51% de las personas encuestadas viven en el Centro parroquial, seguido del 28% que vive en la comunidad de Santa Cruz y un 7 % en las comunidades de Motilones, Yuibug y Chontapamba, respectivamente. Dando a entender de esta manera que las zonas más pobladas de la parroquia Bilbao son el Centro parroquial y Santa Cruz.

### Pregunta N°2: ¿Qué tipo de actividad agropecuaria realiza?



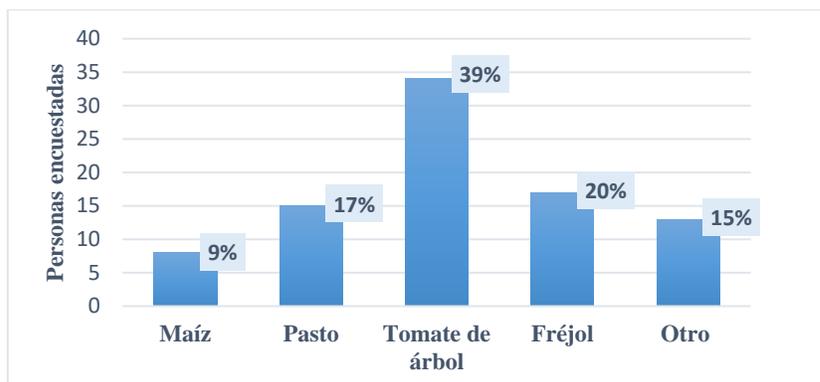
**Gráfico 4-3.** Actividades agropecuarias de la parroquia Bilbao.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### Interpretación:

El 56 % de los habitantes encuestados tienen como principal actividad agropecuaria la agricultura y ganadería, el 35% se dedica únicamente a la actividad agrícola, mientras que solo el 9% de los encuestados se dedican a la ganadería; los pobladores que desarrollan en mayor porcentaje las dos actividades agropecuarias son del Centro Parroquial en un 26% y Santa Cruz en un 16%, respecto a las otras comunidades. Llevando a concluir que la principal actividad agropecuaria de Bilbao es la agricultura.

### Pregunta N°3: ¿Qué productos agrícolas cultiva usted?



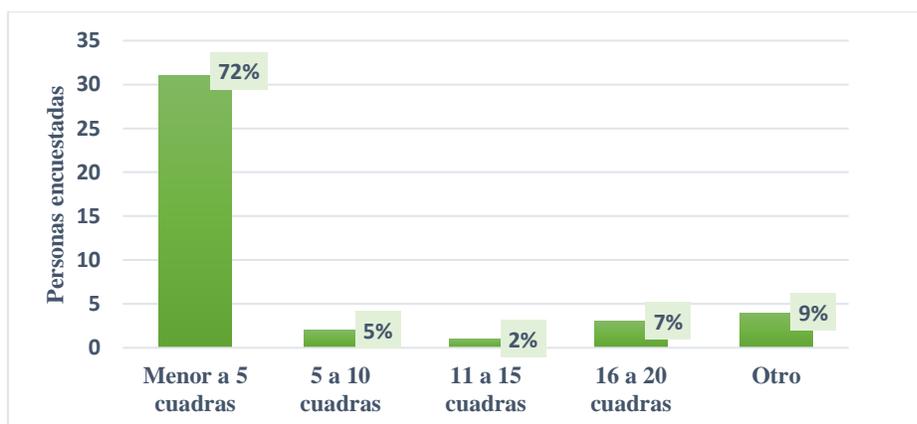
**Gráfico 5-3.** Productos agrícolas cultivados en la parroquia Bilbao.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### Interpretación:

A nivel agrícola los cultivos predominantes en la zona son tomate de árbol, fréjol y pasto; el 39 % de los encuestados se dedican al cultivo de tomate de árbol, el 20 % al cultivo de fréjol, un 17 % al de pasto, el 15% de las personas encuestadas optó por la opción de otro en la que mencionaron que sus cultivos son de mora y granadilla, en último lugar se encuentra el cultivo de maíz con un 9%. El cultivo de pasto, el cual va a ser analizado en este estudio es el tercer cultivo predominante en la parroquia Bilbao.

### Pregunta N°4: ¿Cuál es la extensión del terreno cultivable que usted posee?



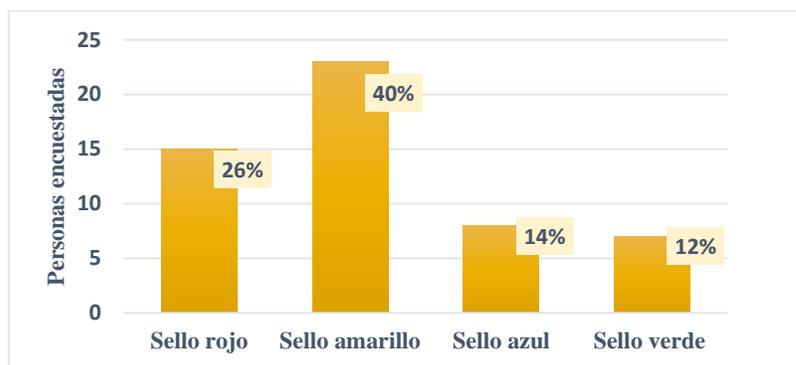
**Gráfico 6-3.** Extensión de terreno cultivable de la parroquia Bilbao.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### **Interpretación:**

Del total de las personas encuestadas el 72% cuenta con una extensión de terreno cultivable menor a 5 cuadras, el 9% cuenta con una extensión superior a 20 cuadras, el 7% de los encuestados tiene una extensión de 16 a 20 cuadras, el 5% tiene de 5 a 10 cuadras y, por último, el 2% tienen de 11 a 15 cuadras de terreno. Los terrenos cultivables con una extensión superior a 16 cuadras se encuentran en las comunidades de Motilones, Chontapamba y Santa Cruz.

### **Pregunta N°5: ¿Qué tipo de plaguicida utiliza?**



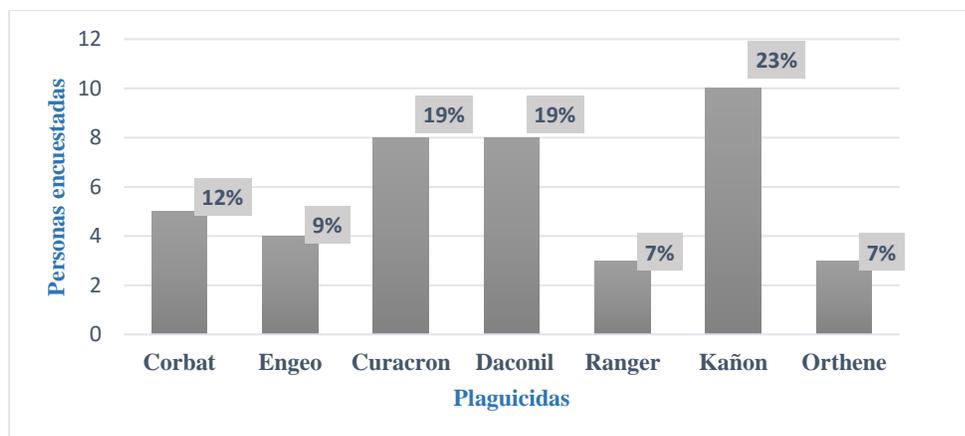
**Gráfico 7-3.** Plaguicidas utilizados en la parroquia Bilbao.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### **Interpretación:**

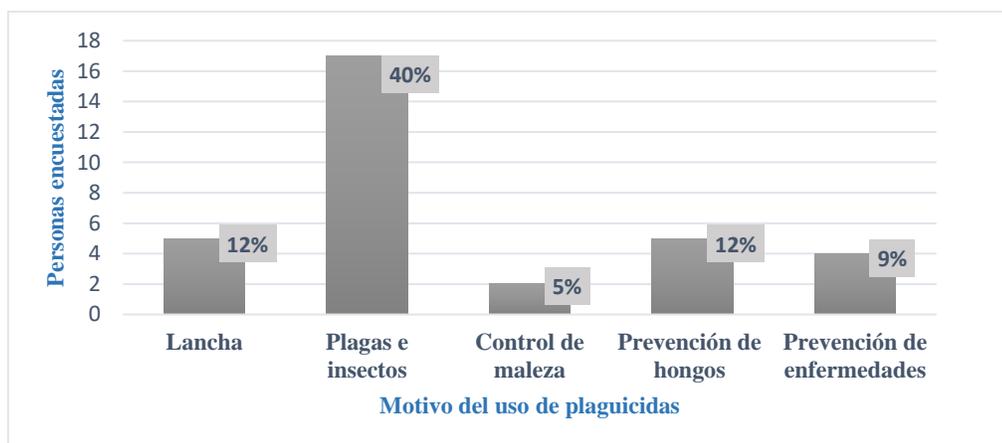
Los plaguicidas mayormente utilizados son el sello amarillo con un 40 %, seguido del sello rojo con un 26%, el sello azul es utilizado en un 14 % y con un 12 % el sello verde. Las comunidades que más uso hacen de estos químicos son Santa Cruz y el Centro Parroquial. Lo que lleva a concluir que los plaguicidas mayormente utilizados pertenecen a la categoría II (amarillo) y a la categoría I (rojo) los cuales son moderadamente peligrosos y extremadamente peligroso, respectivamente; suponiendo un riesgo para la salud, por un uso inadecuado de plaguicidas.

**Pregunta N°6: ¿Cuál es el nombre de los plaguicidas que usted utiliza con más frecuencia en sus cultivos y por qué?**



**Gráfico 8-3.** Nombres de plaguicidas utilizados en la parroquia Bilbao.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.



**Gráfico 9-3.** Motivo de uso de plaguicidas.

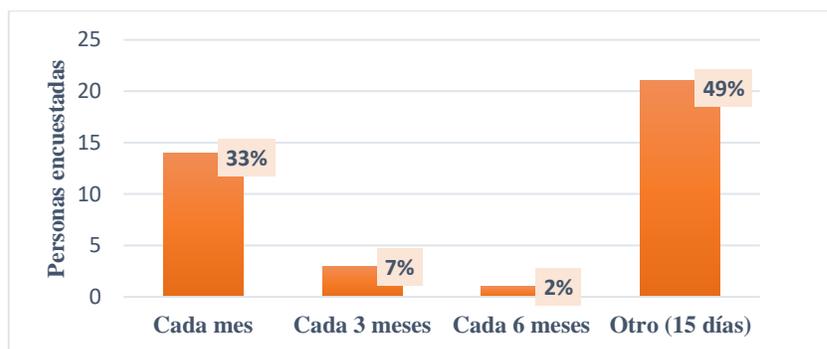
Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

**Interpretación:**

Los plaguicidas más utilizados en los cultivos por las personas encuestadas son: Kañón con un 23%, Daconil y Curacrón con un 19%, Corbat con un 12%; estos plaguicidas son utilizados principalmente para el control de plagas e insectos con un 40%, para la lancha y prevención de hongos con un 12 %, control de maleza y prevención de enfermedades con un 5%. La gran mayoría de plaguicidas utilizados pertenecen a la categoría II (moderadamente peligroso); a partir de estos datos se concluye que los usos de estos plaguicidas tienen como objetivo evitar la pérdida de los

cultivos a causa de las plagas y por ende evitar pérdidas económicas, debido a que la agricultura es la principal fuente económica de la parroquia Bilbao.

**Pregunta N°7: ¿Cada qué tiempo realiza la fumigación con plaguicidas en sus terrenos?**



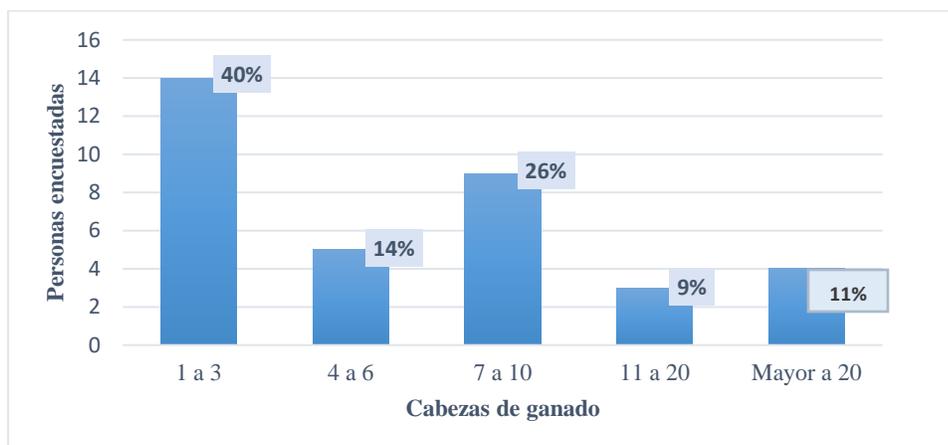
**Gráfico 10-3.** Frecuencia de fumigación de los cultivos de la parroquia Bilbao.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

**Interpretación:**

Con respecto a la frecuencia de fumigación de los sembríos con plaguicidas, el 49 % de las personas encuestadas lo realizan cada 15 días, el 33% lo realiza cada mes, el 7 % cada 3 meses y el 6 % cada 6 meses. De esto se deduce que un gran porcentaje de personas encuestadas fumigan sus cultivos dos veces al mes lo que puede suponer un riesgo para la salud debido a que los plaguicidas utilizados son moderada y severamente peligrosos.

### Pregunta N°8: ¿Cuántas cabezas de ganado posee?



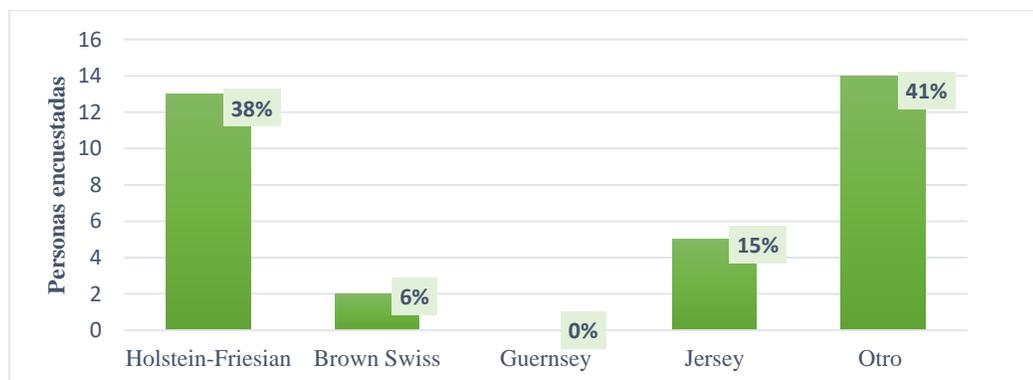
**Gráfico 11-3.** Número de cabezas de ganado.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### Interpretación:

En la actividad ganadera, el 81 % de las personas encuestadas poseen ganado vacuno, de las cuales el 40 % posee de 1 a 3 cabezas de ganado, el 26% posee de 7 a 10, el 14% tiene de 4 a 6, el 11% tiene mayor a 20 y el 9% de 11 a 20 cabezas de ganado. Las personas que poseen una cantidad de cabezas de ganado superior a 11 se encuentran ubicadas en las comunidades de Motilones, Chontapamba y Yuibug. Cabe recalcar, que una parte del ganado de Bilbao es lechero y otro porcentaje es destinado a la producción de carne.

### Pregunta N°9: ¿Cuál es la raza de su ganado?



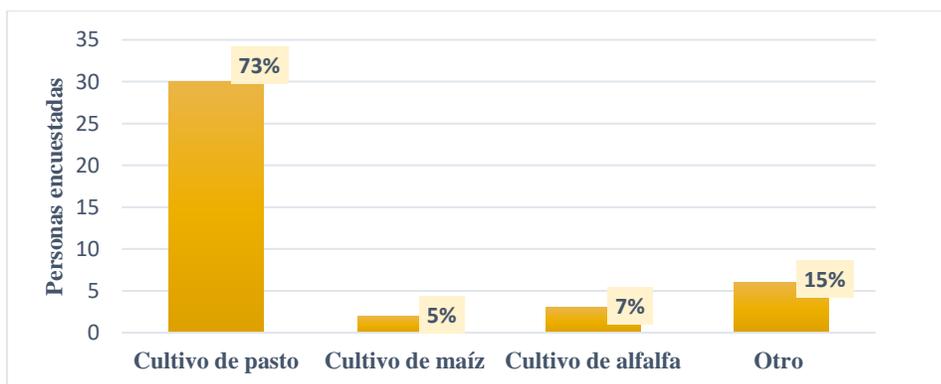
**Gráfico 12-3.** Raza del ganado vacuno.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### Interpretación:

El 38% del ganado es de raza Holstein-Friesian, el 41% corresponde a una raza cruzada, el 6 % es Brown Swiss y el otro 15% corresponde a la raza Jersey. De estos datos obtenidos se puede concluir que el ganado predominante en la parroquia Bilbao es una cruce de varias razas, este se puede deber a que el costo económico es menor en comparación con la compra de un ganado de raza pura, en segundo lugar, se encuentra la raza Holstein, la cual se caracteriza por tener una buena adaptabilidad y una buena producción de leche y de carne, siendo este uno de los motivos por el cual los pobladores de la parroquia adquieren este tipo de ganado.

### Pregunta N°10: ¿Qué tipo de actividad agrícola realiza para la alimentación de su ganado vacuno?



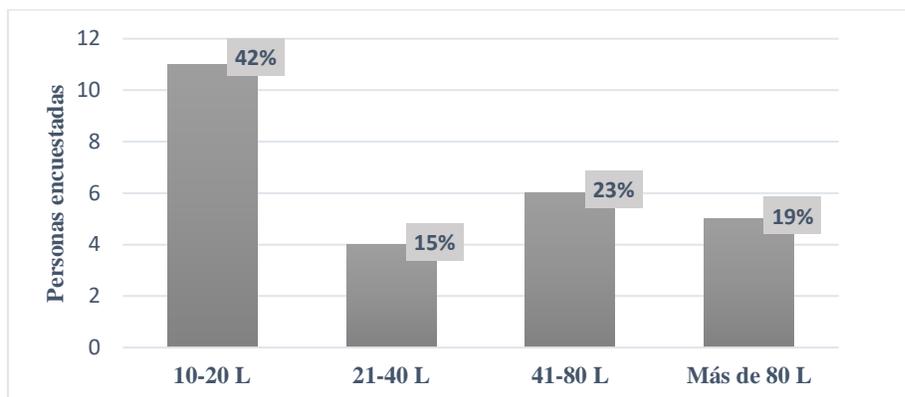
**Gráfico 13-3.** Alimentación del ganado vacuno.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### Interpretación:

La principal actividad agrícola realizada para la alimentación de ganado vacuno en las cinco comunidades es el cultivo de pasto con un 73%, los cultivos de maíz y de alfalfa son complementarios para la alimentación del ganado. Por tal motivo es indispensable la realización del estudio de pasto ya que al ser consumido por el ganado se puede dar la transferencia de varios metales pesados los cuales pueden ser excretados a través de la leche y de esta manera estar presentes a la cadena alimentaria lo que puede generar riesgos en la salud al encontrarse en concentraciones elevadas.

**Pregunta N°11: ¿Cuántos litros de leche al día produce su ganado?**



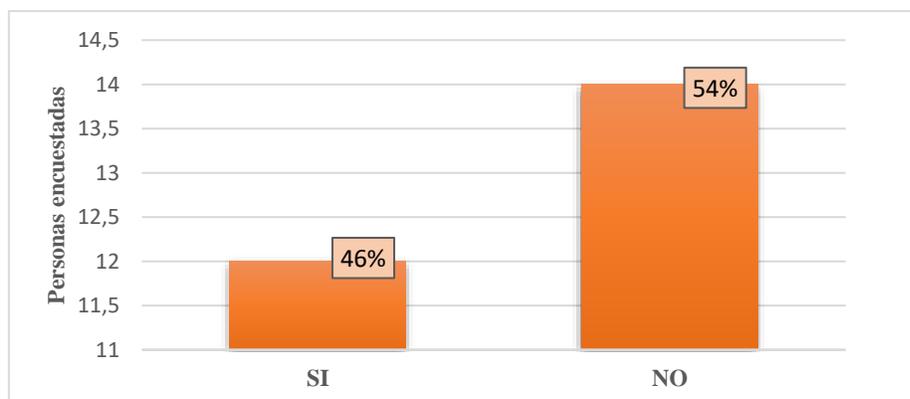
**Gráfico 14-3.** Litros de leche producidos al día.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

**Interpretación:**

Del total de personas encuestadas el 65% se dedican a la actividad ganadera (gráfico 4-3), de este porcentaje el 60% tienen ganado lechero. Del total de encuestados que poseen ganado lechero el 42% produce de 10-20 L al día, el 15% produce de 21-40 L, el 23% produce de 41-80 L y el 19% produce más de 80 L. Por lo que se concluye que la ganadería de la parroquia Bilbao está dedicada en mayor porcentaje a la producción de leche. Las personas con mayor producción lechera (> 80 L al día) se encuentran en la comunidad de Motilonos (8%), Santa Cruz, Centro Parroquial y Chontapamba con un 4% cada una.

**Pregunta N°12: La leche que su ganado produce tiene alguna línea de distribución**



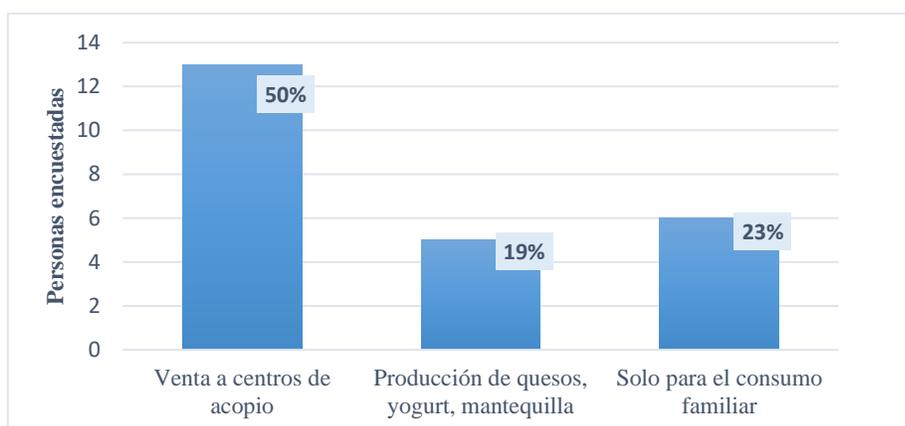
**Gráfico 15-3.** Líneas de distribución de la leche producida en Bilbao.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### Interpretación:

Del total de personas que tienen producción lechera el 54 % no tiene línea de distribución y el 45 % si tiene. Las personas que no tienen línea de distribución son aquellas que su producción de leche al día no supera los 20 L o aquellas personas que utilizan su leche para elaboración de quesos o diversos productos lácteos de forma artesanal.

### PreguntaN°13: ¿Cuáles son las líneas de distribución de la leche que produce?



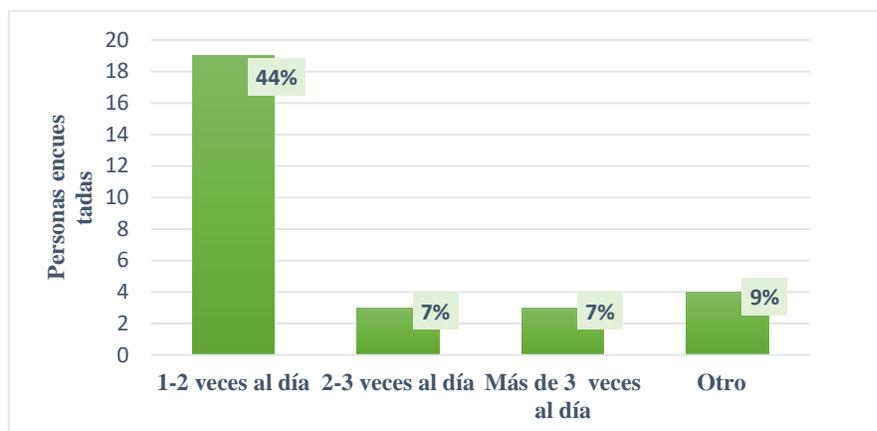
**Gráfico 16-3.** ¿Cuáles son las líneas de distribución de la leche que produce?

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### Interpretación:

Respecto a las líneas de distribución el 50% de los encuestados venden su producto a centros de acopio, el 19% lo destina a la producción de quesos, yogurt y mantequilla y el otro 23 % lo destina al consumo familiar. Por lo que se puede decir que las personas con mayor producción lechera son aquellas que venden la leche a centros de acopio, mientras que las personas con menor producción lo utilizan para a la elaboración de derivados lácteos y para consumo familiar.

**Pregunta N°14: ¿Con qué frecuencia consume la leche producida en el sector?**



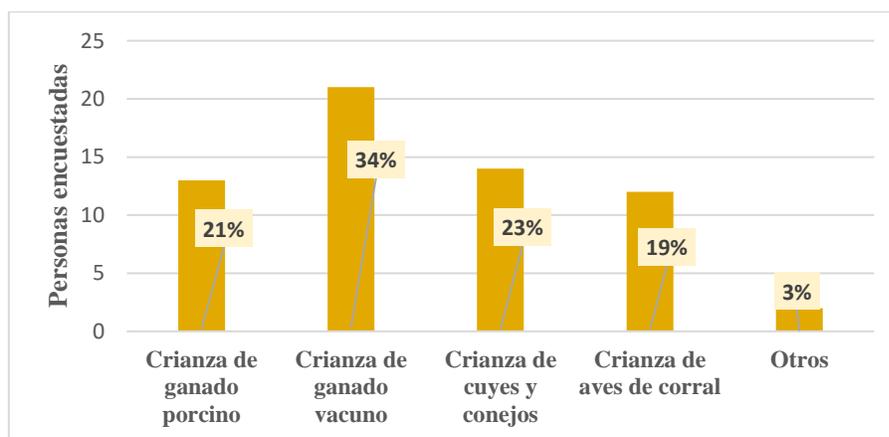
**Gráfico 17-3.** Frecuencia del consumo de leche.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

**Interpretación:**

El 44 % de los encuestados indican que la leche producida en el sector es consumida de 1 a 2 veces al día, mientras que el 7 % indica que consumen leche de 2-3 y más de 3 veces al día. De estos datos se concluyó que la leche es un alimento fundamental en la dieta de los pobladores de la parroquia Bilbao y por ende fue necesario realizar un análisis fisicoquímico para conocer si cumple con la normativa vigente en el Ecuador INEN 9.

**Pregunta N°15: ¿Qué tipo de actividades pecuarias realiza en su comunidad?**



**Gráfico 18-3.** Tipos de actividades pecuarias.

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### **Interpretación:**

Con respecto a la actividad pecuaria el 34 % de encuestados se dedican a la crianza de ganado vacuno, el 23 % se dedica a la crianza de cuyes y conejos, el 21 % a la crianza de ganado porcino, 19 % a la crianza de aves de corral y, por último, el 9 % eligió la opción otro en la cual algunos encuestados mencionaron la crianza de borregos. Con estos resultados se deduce que la principal actividad agropecuaria desarrollada en Bilbao es la crianza de ganado vacuno por lo cual este estudio se enfocó en la determinación de metales pesados consumidos por el ganado vacuno y así analizar cuál es la incidencia en la cadena alimentaria.

### **3.2. Resultado del diseño experimental de muestreo**

Para este estudio se tomaron en cuenta 7 puntos de muestreo correspondientes a la Parroquia Bilbao, los cuales se encuentran distribuidos entre las comunidades de Santa Cruz, Chontapamba, Motilones y Yuibug. De cada punto se tomaron muestras de tres matrices: suelo, forraje y leche.

**Tabla 1-3:** Identificación de los puntos de muestreo de la parroquia Bilbao.

<b>PARROQUIA BILBAO</b>			
<b>Comunidad</b>	<b>N ° de Identificación</b>	<b>Coordenadas</b>	
		<b>X</b>	<b>Y</b>
<b>Santa Cruz</b>	1	778437,9	9840400,7
<b>Santa Cruz</b>	2	79124,5	39960,0
<b>Motilones</b>	3	78921,0	38614,1
<b>Motilones</b>	4	77861,8	39786,0
<b>Chontapamba</b>	5	78990,6	38164,8
<b>Chontapamba</b>	6	77620,4	38506,1
<b>Yuibug</b>	7	77100,0	36790,2

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

### 3.3. Resultados de los análisis fisicoquímicos del suelo

**Tabla 2-3:** Resultados del análisis fisicoquímico de las muestras de suelo.

Muestra	pH	CE	MO	Dr	Da	Textura
		(dS/m)	(%)	(g/cm <sup>3</sup> )	(g/cm <sup>3</sup> )	
S01	5,96 b	0,08 b	0,3501 e	2,4100 a	1,1367 a	Franco arenoso
S02	5,79 a	0,06 ab	0,3049 c	2,4767 b	1,2167 b	Franco
S03	5,70 a	0,05 ab	0,3255 d	2,3967 a	1,2500 bc	Franco arenoso
S04	6,36 c	0,02 a	0,0853 a	2,5033 c	1,2933 c	Franco limoso
S05	7,41 d	0,39 c	0,3670 f	2,4967 c	1,1500 a	Franco arenoso
S06	6,06 b	0,08 b	0,1175 b	2,6233 d	1,3600 d	Franco arenoso
S07	6,38 c	0,03 ab	0,0873 a	2,6633 e	1,5000 e	Franco arenoso
F-ANOVA	296,188	169,160	4344,811	563,933	101,415	
	***	***	***	***	***	

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

S= Muestra de suelo, pH= Potencial de hidrogeno, CE= Conductividad eléctrica, MO= Materia orgánica, Dr= Densidad real, Da= Densidad aparente

\*\*\* Diferencia significativa con un 99,9 % de confiabilidad.

a, b, c, d, e, f Letras pertenecientes a cada grupo.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de las diferentes matrices se realizó mediante el software SPSS 5.0. Las pruebas estadísticas realizadas en los datos obtenidos de los análisis de las diferentes matrices fueron el análisis de varianza ANOVA para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de cada punto de muestreo para una variable o tratamiento dado, a la vez se realizó la prueba de rango post hoc para identificar subconjuntos homogéneos de las medias que no se diferenciaban entre sí, los grupos fueron separados por letras, y finalmente se aplicó la prueba de TUKEY-b para hacer comparaciones entre pares de tratamientos o variables

En la tabla 2-3 se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos de las muestras suelos desarrollados en los laboratorios de la ESPOCH.

#### 3.3.1. Densidad real

La Densidad real (Dr) designa la densidad específica de la fase sólida del suelo. El valor promedio de las distintas partículas presentes en el suelo es de 2.65 g/cm<sup>3</sup> (Andrades et al., 2015: p.35).

Las variaciones a las que está sometida la densidad real están relacionadas con el contenido de materia orgánica y la composición mineralógica. La densidad del humus es baja: 1,2 a 1,7 g/cm<sup>3</sup>, mientras que la presencia de minerales pesados cuya densidad es elevada puede superar al promedio señalado con un valor de 2,75 g/cm<sup>3</sup>. De esta forma la densidad varía según el tipo de suelo, los arenosos presentan entre 2,63 - 2,67 g/cm<sup>3</sup>; los limosos entre 2,65 – 2,70 g/cm<sup>3</sup>; los arcillosos entre 2,67 - 2,90 g/cm<sup>3</sup> y los orgánico menor a 2 g/cm<sup>3</sup> (Villaseñor, 2016, pp.52-55).

Los resultados de Densidad real (Dr) de las muestras de suelo (tabla 2-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 % y forman varios grupos separados por letras con características similares. Los suelos del grupo “a, b y c” presentan una Dr ligeramente inferior respecto al rango de referencia de los suelos con textura franco-arenoso mientras que los suelos de los grupos “d y e” presentan un Dr propia de los suelos con textura franca arenosa. La disminución de la Dr de los grupos “a, b y c” se debe a que presentan mayor porcentaje de MO respecto a los otros grupos.

### 3.3.2. *Densidad aparente*

La densidad aparente (Da) de un suelo siempre es inferior a la densidad real, incluye huecos y poros que contenga, aparentes o no, su valor depende de la textura, de la estructura del suelo y de su contenido en materia orgánica (Andrades et al., 2015: p.53).

Suelos con valores altos de Da determinan un ambiente pobre para el crecimiento de raíces, debido a la poca aireación y una baja infiltración del agua en el suelo pudiendo provocar anegamiento, anoxia y que las raíces tengan dificultad para elongarse y penetrar hasta alcanzar el agua y los nutrientes. Mientras que valores bajos son propios de suelos porosos, bien aireados, con buen drenaje y buena penetración de raíces, lo que permite un buen desarrollo de las mismas (Rubio, 2019, pp.22-23).

Los valores de referencia de Da con relación a la textura son: suelos franco-arenoso menor (<) a 1,6 g/cm<sup>3</sup> suelos francos y franco-limosos menor (<) a 1,4 g/cm<sup>3</sup> (USDA, 2015).

Los resultados de Densidad a (Da) de las muestras de suelo (tabla 2-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 % y forman varios grupos separados por letras. Todos los suelos presentan una Da dentro del valor referencia de los suelos franco-arenosos, franco y franco limosos lo que indica una porosidad, aireación, drenaje y penetración de raíces adecuada para el desarrollo vegetal. Los grupos “d y e” presentan mayor Da debido a que la MO de estos suelos es relativamente baja.

### **3.3.3. pH**

Los resultados del potencial de hidrógeno (pH) de las muestras de suelo (tabla 2-3), presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 % debido a que varios puntos coinciden formando subconjuntos iguales, esta similitud se debe a que la Parroquia Bilbao es una zona afectada por la actividad del volcán Tungurahua y por ende el suelo posee una gran cantidad de ceniza volcánica. La acidez de la ceniza puede variar entre volcanes y erupciones, al encontrarse en el suelo aporta una elevada concentración de azufre y por ende una acidificación del suelo (Servicio Geológico de los Estados Unidos, 2015).

La normativa nacional vigente Acuerdo Ministerial 097-A menciona que el intervalo óptimo de pH para los cultivos es de 6-8 es decir neutro o próximo a la neutralidad, debido a que los suelos presentan una mejor disponibilidad de nutrientes, además de encontrarse en un equilibrio más adecuado (Andrades y Martínez, 2014; pp.16-17).

Del total de las muestras de suelos analizadas solo la muestra S05 está en el rango de neutralidad con un valor de 7,41; las muestras pertenecientes a los grupos “b” y “c” están en un rango de acidez de 5,5 a 6,5 cumpliendo con lo establecido en la normativa; sin embargo, las muestras del grupo “a” presentan un valor de pH inferior a 6 lo que puede generar dificultad en la absorción de nutrientes, crecimiento de la planta y desarrollo radicular.

Los suelos analizados al ser en su mayoría ácidos tienden a ser susceptibles a tener concentraciones elevadas de aluminio, manganeso y hierro, lo que disminuye la asimilación de fósforo, nitrógeno, sulfatos y molibdatos por parte de los cultivos, debido a que se forman precipitados insolubles (Moncada, et al., 2016, p.26). Por tal motivo, las concentraciones de fósforo en el forraje analizado están debajo del rango establecido. La adsorción de MP en el suelo es dependiente del pH, al cumplir la mayoría de las muestras con los rangos establecidos, la adsorción de MP en la superficie del suelo es buena, por lo tanto, los metales no regresan en gran porcentaje a la solución del suelo de la cual una parte es absorbida por la planta (Rodríguez, et al., 2019, p.41), por tal motivo, en la determinación de metales pesados en el forraje por espectroscopía de absorción atómica se halló concentraciones solo de selenio, a pesar de encontrar arsénico y selenio en suelo.

### **3.3.4. Conductividad eléctrica**

La determinación de la conductividad eléctrica (CE) permite conocer la cantidad de sales presentes en el suelo, debido a que un exceso de estas dificulta el correcto desarrollo de las plantas. La normativa nacional vigente en el Acuerdo Ministerial 097-A, establece una CE límite para suelos de

2 mmhos/cm = 2dS/m, por tal motivo todos los grupos de muestras están dentro del rango normal y son considerados suelos no salinos, además esto nos indica que los suelos presentan un carácter ligera y moderadamente ácido.

Además, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) menciona que una CE entre 0-0,8 dS/m es óptimo para el crecimiento de cualquier tipo de planta.

### **3.3.5. *Materia orgánica***

La materia orgánica (MO) de los suelos influye decisivamente en sus propiedades físicas (retención de agua, estructuración y aireación del suelo), químicas (C.I.C., poder de amortiguación del suelo, etc.) y biológicas. El contenido de MO en la mayoría de los suelos fértiles oscila entre el 1 y 5 % y varía de suelo en suelo dependiendo del material vegetal, de la textura del suelo (% arcilla) y del pH (determina la mayor o menor existencia de microorganismos) (Andrades et al., 2015: p.61).

Los resultados de materia orgánica (MO) de las muestras de suelo (tabla 2-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 % y forman varios grupos separados por letras. Todos los suelos presentan un porcentaje de MO por debajo del rango óptimo para el desarrollo adecuado de los forrajes. Esta deficiencia de MO dificulta en el caso de los suelos arenosos el desarrollo de una buena estructura del suelo, desfavoreciendo la aireación y la capacidad de retención de agua. Los datos obtenidos reportan además un porcentaje de MO muy bajo para el tipo de textura encontrado, puesto que un contenido normal de MO en suelos francos oscila entre 1,5 y 2 % y en suelos arenoso entre 1,2-1,7 %.

Estos resultados se relacionan por un lado con la capa de ceniza observada a lo largo del horizonte A en la toma de muestras y con los niveles deficientes de fosforo y moderadamente de potasio encontrados en los forrajes.

### **3.3.6. *Textura***

La textura es una propiedad que influye en la fertilidad de los suelos al influir en la aireación, capacidad de retención de agua y capacidad de retención de nutrientes. En función de la textura los suelos presentaran mayor o menor productividad (Andrades, 2014, p.16).

Según la clasificación de textura del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), el 72% de los suelos analizados son franco-arenosos, con porcentajes promedio de arena de 59,5; limo 34,7 y arcilla 4,9; estos suelos son incapaces de almacenar suficiente agua para el crecimiento

adecuado de las plantas, además que tienden a perder nutrientes minerales por lixiviación hacia el subsuelo. Este tipo de textura hace que el rendimiento de los pastizales sea medio.

El otro 14 % de los suelos analizados presentan textura franca con porcentajes promedio de arena de 46,7 %; limo 45,6 % y arcilla 7,7 %; esta textura permite un rendimiento alto en los pastizales al ser suelos con excelentes depósitos de agua y reserva de minerales que pueden ser utilizados con facilidad por los vegetales, además las condiciones de aireación y exploración de las raíces se encuentran favorecidas. Por último, el 14% de los suelos analizados restantes son franco-limosos con porcentajes promedio de arena de 40,2; limo 51,6 y arcilla 8,2. Al igual que los suelos franco-arenosos presentan un rendimiento medio en los pastizales por una aireación insuficiente y problemas de infiltración para el crecimiento normal de las plantas.

### 3.4. Resultados del análisis de macronutrientes y metales pesados en el suelo

En la tabla 3-3 se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos de las muestras suelos desarrollados en los laboratorios de la ESPOCH.

**Tabla 3-3:** Resultados de macronutrientes y metales pesados en suelo.

Muestra	K	P	C	N	Pb	Cd	Hg	As	Se
	(%)	(%)	(%)	(%)	(ppm)	(ppm)	(ppb)	(ppb)	(ppb)
S01	0,0933 d	0,0322 c	1,4695 a	0,2450 a	<10	<0,5	<100	54,94 a	<300 a
S02	0,1026 e	0,0241 a	1,0955 a	0,2735 a	<10	<0,5	<100	398,86 g	<300 a
S03	0,0862 b	0,0239 a	1,385 a	0,6785 ab	<10	<0,5	<100	359,46 f	<300 a
S04	0,0853 a	0,0302 c	0,5190 a	0,8700 b	<10	<0,5	<100	314,23 e	<300 a
S05	0,1102 g	0,0299 bc	1,3760 a	1,0310 b	<10	<0,5	<100	280,88 d	407,69 d
S06	0,0908 c	0,0299 bc	0,9615 a	0,9280 b	<10	<0,5	<100	111,14 b	333,42 c
S107	0,1073 f	0,0263 ab	0,6740 a	1,2290 b	<10	<0,5	<100	157,13 c	324,71 b
<b>F-</b>	2563,625	19,111	4,067	12,663				17401,06	2079,596
<b>ANOVA</b>	***	**	NS	**				4 ***	***

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

S= Muestra de suelo, K= Potasio, P= Fósforo, C= Carbono, N= Nitrógeno, Pb= Plomo, Cd= Cadmio, Hg= Mercurio, As= Arsénico, Se= Selenio

\*\*\* Diferencia significativa con un 99,9 % de confianza

\*\* Diferencia significativa con un 99 % de confianza

NS= No existe diferencia significativa

a, b, c, d, e, f, g Letras pertenecientes a cada grupo

### 3.4.1. *Potasio y Fósforo*

El potasio en el suelo se encuentra en cuatro formas, las cuales difieren en su disponibilidad para los cultivos. De mayor a menor disponibilidad esta: el potasio en solución, el potasio intercambiable, el potasio no intercambiable y el potasio mineral (García y Quinke, 2012: p.10). El potasio intercambiable y en solución constituye el potasio disponible para la nutrición de las plantas, el rango normal en porcentaje se encuentra entre 0,1 y 2%. La disponibilidad del potasio se encuentra a un pH entre 6 y 10 (Hernández et al., 2010: pp-5-15).

Los resultados de potasio (K) de las muestras de suelo (tabla 3-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 % y forman varios grupos separados por letras. Los suelos del grupo “e, f y g” presentan una concentración de potasio dentro del rango normal, los valores obtenidos se encuentran entre 0,1026 y 0,1102 %. El pH de los suelos de estos grupos se encuentra entre 5,70 y 7,41 medio donde el potasio está disponible.

Por otro lado, los grupos “a, b, c, d” presentan una concentración de potasio deficiente, los valores hallados de 0,0853 - 0,0933% se encuentran por debajo del 0,1%. La deficiencia de este elemento se debe a que los suelos de dichos grupos presentan un pH inferior al 6,36 medio donde el potasio no se encuentra disponible.

El fósforo al igual que el potasio es también un elemento fundamental para la nutrición de las plantas. De acuerdo a su disponibilidad mediata o inmediata para los cultivos este elemento se clasifica en soluble, intercambiable e insoluble. Las formas solubles que son las más disponibles se presentan como fosfatos diácidos ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y monoácidos ( $\text{HPO}_4^{=}$ ). La concentración del fósforo total generalmente es alto pero las concentraciones disponibles son muy bajas debido a las diferentes reacciones que ocurren en el suelo, un rango normal se varía entre 0.02 y 0.08% (Nolasco, 2016, p.3).

Los resultados de fósforo (P) de las muestras de suelo (tabla 3-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99 % y forman varios grupos separados por letras. Todos los grupos de suelos presentan un porcentaje de fósforo adecuado, los valores obtenidos se encuentran entre 0,02% y 0,03%. Estas concentraciones un tanto bajas se deben a que el pH de las muestras de suelo se encuentra entre 5,70 y 7,4 y el medio más favorable para la disponibilidad de fósforo es a un pH de 6,5 a 7,5.

### 3.4.2. Carbono y Nitrógeno

Los resultados de carbono (C) en las muestras de suelo (tabla 3-3), no presentan diferencia significativa entre sí, por lo que todos los resultados se encuentran en un solo grupo; los porcentajes obtenidos son bajos los cuales están entre 0,5190%-1,4695%; el Departamento de agricultura de Australia (2013) menciona que la concentración de C puede ser tan bajo como 0,3% en suelos desérticos y alto como 14% en suelos productivos. Además, existe una relación inversamente proporcional en la mayoría de los resultados entre el % C y la densidad aparente, es decir a menor %C existe un mayor valor de densidad aparente.

El COS (carbono orgánico del suelo) es indispensable para la fertilidad del suelo, además se encuentra asociado a la materia orgánica debido a que esta contribuye a la retención, renovación de nutrientes y al secuestro de carbono; aproximadamente el 45% de materia orgánica existe como C (Departamento de agricultura de Australia, 2013). Por lo que se puede deducir que el %C presente en las muestras es bajo debido a que la materia orgánica en el suelo analizado es menor al 0,5%. Además, los suelos de Bilbao analizados tienen un mayor porcentaje de arena lo que limita la retención de C, debido a que la materia orgánica tiende a descomponerse más rápido porque no se encuentra protegida a diferencia de los suelos con elevada cantidad de arcilla que tienen la propiedad de proteger la materia orgánica.

El nitrógeno (N) es un macronutriente esencial para el correcto desarrollo de la planta, en el suelo se encuentra presente en forma orgánica (98%) e inorgánica (2%), siendo las formas absorbibles de N por las plantas los nitratos ( $NO_3^-$ ) y amoníaco ( $NH_4^+$ ) (Bonadeo et al., 2017: p.245). Los resultados del porcentaje de N presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 95%, existiendo varios puntos que coinciden formando subconjuntos, en el grupo “a” están las muestras con un porcentaje de N de 0,2%, en el grupo “b” están las muestras con un porcentaje mayor a 0,8% y en el grupo “ab” está la muestra S03 con un porcentaje intermedio, con estos datos se puede decir que el suelo no presenta deficiencias de N, ya que diversos autores mencionan que el contenido de N en la capa arable de la mayoría de los suelos cultivados es de 0,02 a 0,4 %,sin embargo algunas muestras presentan un exceso el cual no es considerado como tóxico (Bonadeo et al., 2017: pp. 245-246).

### 3.5. Resultados de Metales Pesados en suelo

El Acuerdo Ministerial 097 Anexo 1 (2015), documento que regula los criterios de calidad ambiental que deben cumplir los suelos, establece que los límites de concentración de metales

pesados tales como plomo, cadmio, mercurio, arsénico y selenio en ppm (mg/Kg) son de 19; 0,5; 0,1; 12 y 1 respectivamente.

Los resultados de la concentración de arsénico y selenio de las muestras de suelo (tabla 3-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 %. Los resultados de las concentraciones de plomo, cadmio, mercurio, arsénico y selenio de las muestras de suelo se encuentran por debajo del límite de detección del método aplicado y por debajo de límite máximo permisible establecido por la norma ecuatoriana.

### 3.6. Resultados de Metales Pesados en la raíz

En la tabla 4-3 se muestran los resultados de los análisis de metales pesados realizados en las muestras de raíz.

**Tabla 4-3:** Resultados de metales pesados en las muestras de raíz.

Muestra	Pb	Cd	Hg	As	Se
	(ppm)	(ppm)	(ppb)	(ppb)	(ppb)
<b>R01</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	317,93 a
<b>R02</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	350,94 b
<b>R03</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	406,93 c
<b>R04</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	1023,29 g
<b>R05</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	485,06 d
<b>R06</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	638,80 e
<b>R07</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	814,57 f
<b>F-ANOVA</b>					69171,726 ***

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

\*\*\* Diferencia significativa con un 99,9 % de confianza

a, b, c, d, e, f, g Letras pertenecientes a cada grupo

La Norma Técnica Ecuatoriana del Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN-CODEX 193 (2013) establece que en las raíces los límites máximos de concentración de metales pesados tanto para el plomo como para el cadmio son de 0,1 ppm (mg/Kg). Esta norma no establece los límites máximos de concentración para mercurio, arsénico y selenio. Por su parte el Mercado Común del Sur MERCOSUR GMC/RES. N° 12/11 establece que el límite máximo de

concentración de arsénico en raíces es de 0,2 ppm (mg/Kg) y el Acuerdo Ministerial 097 Anexo 2 (2015), que regula los criterios de calidad del agua para consumo humano y doméstico, establece que los límites de concentración de mercurio y selenio son de 0,006; y 0,01 ppm (mg/Kg) respectivamente.

Los resultados de las concentraciones de selenio en las muestras de raíz (tabla 4-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 %. Dichos valores superan el límite máximo permisible establecido por la norma ambiental ecuatoriana de agua. Por su parte las concentraciones de arsénico a pesar de encontrarse por debajo de límite de detección del método no superan el límite máximo permisible establecido por la norma ambiental ecuatoriana de agua. El resto de los metales (plomo, cadmio, y mercurio) presentan concentraciones por debajo del límite de detección del método aplicado, y al no obtener valores numéricos como tal no se puede realizar un análisis comparativo con los límites máximos permisibles establecidos por las diferentes normas.

### 3.7. Resultados de los análisis fisicoquímicos de forraje

En la tabla 5-3 se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados en las muestras de forraje.

**Tabla 5-3:** Resultados de los análisis fisicoquímicos de muestras de forraje.

Muestra	pH	CE	MO
		(dS/m)	(%)
<b>F01</b>	5,92 a	7,25 e	84,31 a
<b>F02</b>	6,09 d	5,07 c	87,61 c
<b>F03</b>	5,98 b	4,74 b	86,57 b
<b>F04</b>	6,10 d	4,76 b	90,25 e
<b>F05</b>	6,04 c	7,94 f	88,29 d
<b>F06</b>	6,14 e	6,48 d	84,43 a
<b>F07</b>	5,97 b	4,33 a	87,57 c
	203,963	6694,524	275,417
<b>F-ANOVA</b>	***	***	***

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

**F=** muestra de forraje, **pH=** Potencial de hidrogeno, **CE=** Conductividad eléctrica, **MO=** Materia orgánica.

\*\*\* Diferencia significativa

a, b, c, d, e, f Letras pertenecientes a cada grupo

### **3.7.1. pH**

La determinación de pH en las muestras de tejido vegetal permite conocer el estado de salud de la planta, el rango adecuado es el próximo a la neutralidad (6-7), siendo el valor óptimo de 6,4. La planta se vuelve susceptible a contraer enfermedades al disminuir el pH, ya que se derivan diversos problemas con los nutrientes (Westelab, 2018).

Los valores del pH en el forraje analizado presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 %, los resultados están dentro del rango ácido, de los cuales las muestras del grupo a y b son moderadamente ácidas y las del grupo c, d y e son ligeramente ácidas (Tabla 5-3).

Los resultados obtenidos son muy cercanos e inclusive algunos inferiores al límite más bajo establecido por bibliografía, siendo esta una de las posibles causas para que la concentración de fósforo en el forraje sea baja y por ende el correcto desarrollo de la planta se vea afectado.

### **3.7.2. Conductividad eléctrica**

Los valores de conductividad eléctrica (CE) obtenidos de los extractos acuosos de forraje presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 %; los resultados de CE de todos los grupos (tabla 5-3) oscilan entre 4,33-7,94 dS/m, estos valores aumentaron considerablemente con respecto a los resultados obtenidos en suelo 0,02 – 0,39 dS/m (tabla 2-3), por tal motivo, se deduce que las plantas forrajeras analizadas tienden a absorber en mayor cantidad las sales presentes en el suelo principalmente  $Na^+$  y  $Cl^-$ , acumulándolas en la parte aérea de la planta, la cual es más sensible a sufrir efectos adversos. Una elevada concentración de sales en la planta puede afectar el metabolismo de la misma, generando como consecuencia un déficit en su crecimiento y una insuficiencia de clorofila; pudiendo ser esta una de las razones por las que el forraje de los puntos de muestreo presenta estas características (Lamz y Gonzáles, 2013).

### **3.7.3. Determinación de materia orgánica**

La materia orgánica (MO) de las plantas en general comprende compuestos orgánicos formado por C, H, O, N tales como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. que presentan el 90-95% del peso seco de los vegetales, mientras que el 5-10% restante es muy diverso y constituye la fracción mineral (Pérez, 2017, p.4).

Los resultados de materia orgánica (MO) de las muestras de forraje (tabla 5-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 %. El contenido de MO de los vegetales del grupo “e” se encuentra dentro del rango normal, lo que indica un estado de desarrollo adecuado del forraje, por el contrario, los grupos “a, b, c y d” presentan un contenido de MO ligeramente bajo respecto al rango normal, la disminución está relacionada con la falta de MO, potasio y las variaciones de pH del suelo lo que limita un mejor rendimiento del forraje

### **3.8. Resultados de metales pesados, macro y micronutrientes en el forraje**

En la tabla 6-3 y 7-3 se muestran los resultados de los nutrientes y metales pesados analizados en las muestras de forraje.

**Tabla 6-3:** Resultados de macro y micronutrientes en el forraje.

Muestra	$\text{NO}_3^-$	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{Cl}^-$	Na	K	P	C	N
	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	%	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>F01</b>	1120 c	11000 b	3600 ab	19493,96 b	24,11 b	1,52 d	0,0085 a	48,39 a	2,92 a
<b>F02</b>	680 b	4440 a	5200 b	12995,97 a	1,74 a	1,02 ab	0,0104 b	42,07 a	1,64 a
<b>F03</b>	1120 c	4800 a	2000 ab	14495,51 a	9,20 a	1,32 c	0,0075 a	38,03 a	1,72 a
<b>F04</b>	440 a	14400 c	4800 ab	14995,35 a	41,50 c	0,90 a	0,0075 a	43,44 a	1,00 a
<b>F05</b>	1360 d	6320 a	3200 ab	28491,17 c	39,02 c	1,12 b	0,0099 b	41,34 a	2,52 a
<b>F06</b>	920 c	6320 a	2000 ab	18494,27 b	34,05 c	1,30 c	0,0082 a	38,26 a	2,06 a
<b>F07</b>	920 c	4160 a	1200 a	13995,66 a	20,76 b	0,90 a	0,0083 a	37,46 a	1,54 a
<b>F-ANOVA</b>	51 ***	39,143 ***	4,714 *	67,556 ***	51,277 ***	41,644 ***	24,766 ***	0,147 NS	0,917 NS

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

F= Muestra de forraje,  $\text{NO}_3^-$  = Nitratos,  $\text{PO}_4^{3-}$  = Fosfatos,  $\text{SO}_4^{2-}$  = Sulfatos,  $\text{Cl}^-$  = Cloruros, Na= Sodio, K= Potasio, P= Fósforo, C= Carbono, N= Nitrógeno

\*\*\* Diferencia significativa

a, b, c, d Letras pertenecientes a cada grupo

**Tabla 7-3:** Resultados de metales pesados en el forraje.

Muestra	Pb	Cd	Hg	As	Se
	(ppm)	(ppm)	(ppb)	(ppb)	(ppb)
<b>F01</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	< 300
<b>F02</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	< 300
<b>F03</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	382,3
<b>F04</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	763,71
<b>F05</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	< 300
<b>F06</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	459,04
<b>F07</b>	< 10	< 0,5	< 100	< 75	712,45

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

F= Muestra de forraje, Pb= Plomo, Cd= Cadmio, Hg= Mercurio, As= Arsénico, Se= Selenio

### 3.8.1. Fosfatos

Las plantas absorben fósforo (P) en forma de fosfatos y fosfitos, los fosfatos ( $PO_4^{-3}$ ) en la planta son indispensables pues participan en diversos procesos biológicos y forman parte de moléculas orgánicas, por lo cual es indispensable su presencia dentro de la planta (Mixquititla y Villegas, 2016).

Los resultados de los análisis de fosfatos en el forraje tienen una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 %; los valores oscilan entre 4100-14400 ppm (tala 6-3) los cuales se encuentran conformando 3 grupos (a, b y c) con valores similares. La concentración de fosfatos es mayor a la concentración de fósforo porque cuando se mide fosfato se mide también los 4 átomos de oxígeno enlazados al átomo de P, mientras que al medir el P no se incluyen. Mixquititla y Villegas (2016) mencionan que existe una deficiencia de fosfatos cuando la concentración de P es menor a 0,2%, por lo que los forrajes presentan deficiencia de fosfatos lo que afecta su correcto desarrollo y crecimiento.

### 3.8.2. Nitratos

Una concentración adecuada de nitratos ( $NO_3^-$ ) en el forraje es inferior al 1% (1000 ppm), cuando la concentración está entre 0,44% y 0,66% no se presenta riesgos en el animal que lo consume, en un rango del 0,66 y 1,76% se pueden presentar algunos signos de intoxicación, si la concentración supera el 1,76% se lo puede considerar como forraje tóxico y se debe evitar su consumo (Rosiles y Ávila, 2005; citado en Muñoz et al, 2011: p.2).

Los resultados de  $NO_3^-$  presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 %; las muestras de los grupos a, b y c (tabla 6-3) cumplen con la concentración adecuada, la muestra F05 presenta un leve incremento en su concentración, por lo que se puede presentar algún signo de intoxicación en el ganado que lo consuma. Esta acumulación de nitratos en el forraje se puede deber a que la capacidad de absorción de la planta es mayor en comparación a la capacidad que tiene para sintetizar proteínas a partir de nitratos, otra de las causas es por agregados de estiércol o por cultivos estresados por excesos de fríos (Martínez y Sánchez, 2007: pp.2-3).

### 3.8.3. Sulfatos

Las plantas absorben azufre en forma de sulfatos ( $SO_4$ ), este macronutriente secundario forma parte de las proteínas de las plantas. Los niveles que son considerados como suficientes para el correcto desarrollo de la planta están dentro del rango de 0,1-0,3% es decir de 1000 a 3000 ppm (Correndo y

García, 2012: p.4). Los resultados de sulfatos (tabla 6-3) presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 90%. Las muestras F03, F06 y F07 cumplen con los valores establecidos, sin embargo, los resultados de los puntos restantes presentan un incremento en comparación con el valor de referencia, cabe mencionar que este exceso de sulfatos no es considerado como tóxico, pero provoca un desbalance en el correcto crecimiento de la planta.

#### **3.8.4. Cloruros**

Los niveles de cloruros generalmente son altos en forrajes donde su concentración oscila entre 0,8% y 1,2 % o entre 8000-12000 ppm (Albionlabservices, 2011, p.3). El cloro es un micronutriente esencial para el correcto desarrollo de las plantas debido a que participa en procesos fotosintéticos y osmóticos, es absorbido en forma de ion cloruro además se encuentra estrechamente relacionado con el sodio (Na), una elevada concentración de cloruros genera toxicidad en la planta (Martin, 2018). Las concentraciones obtenidas presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 %; los valores de cloruros en las muestras de forraje son elevados en comparación a lo mencionado anteriormente, la concentración más baja de cloruros está en el grupo “a” siendo de 12995,97 ppm y la más alta en el grupo “d” con un valor de 28491,17 ppm. Estos niveles elevados de cloruros se pueden deber al uso de fertilizantes para pastizales que tienen en su composición sales o purinas, además se lo puede relacionar con las sales solubles que están presentes en la composición de la ceniza volcánica, siendo la principal el cloruro de sodio (Na Cl), debido a que la parroquia Bilbao es una de las zonas más afectados por la actividad volcánica del Tungurahua.

#### **3.8.5. Potasio, Fósforo y Sodio**

El potasio y fosforo están considerados como macronutrientes esenciales para la planta mientras que el sodio no tiene un papel esencial en la planta. El potasio es importante como cofactor enzimático, controlador de osmosis y ayuda a mantener la neutralidad eléctrica (Pérez, 2017, pp.38-40). El fosforo forma parte de nucleótidos (ATP, ADP), ácidos nucleicos, coenzimas, fosfolípidos, etc. (Pérez, 2017, pp.59-61). El sodio por su parte está implicado en la regeneración del fosfoenolpiruvato (enzima que participa en la gluconeogénesis), y puede sustituir al  $K^+$  en algunas funciones. La concentración requerida de potasio es del 1% - 5 %, de fosforo 0,2 %, y de sodio 0,001 % (Pérez, 2017, p.8).

Los resultados de sodio, potasio y fósforo de las muestras de forraje (tabla 6-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 %.

El porcentaje de potasio de los vegetales del grupo “b, c y d” se encuentra dentro del rango normal, los valores oscilan entre 1,02 y 1,52 %, mientras que el grupo “a” presenta una concentración ligeramente baja respecto al nivel óptimo con valores de 0,9%. La deficiencia de este elemento causa clorosis y necrosis en las hojas, así como flacidez en la planta, y en el caso de las raíces las vuelve más susceptibles a adquirir enfermedades.

En cuanto a los porcentajes de fósforo, todos los grupos de las muestras de forraje analizadas presentan valores por debajo de la concentración requerida, el déficit de este elemento provoca enanismo, madurez retrasada, pigmentación verde oscura y antociánicos.

Finalmente, todos los grupos de las muestras de forraje presentan concentraciones de sodio bastante elevadas respecto al nivel óptimo, los datos se hallan desde el 1,74 % al 41,50 %, esta sobresaturación de sodio produce fitotoxicidad en la planta provocando que las raíces y tallos alcancen menor longitud y el número de hojas se reduzca, etc., además de ello la elevada concentración de sodio se da para compensar los bajos niveles de potasio.

Los síntomas de enfermedad de los forrajes analizados por alteración de la concentración de potasio, fósforo y sodio fueron observados en la toma de muestra.

### **3.8.6. Carbono y Nitrógeno**

El carbono es absorbido del suelo o fijado de la atmósfera en forma de dióxido de carbono, es indispensable para procesos fotosintéticos o metabólicos necesarios para el correcto desarrollo de la planta. La FAO (2013) menciona que una concentración adecuada de carbono en las plantas es de 42%; pero este valor puede variar desde 34.6 % en las hierbas de las praderas a 52.8 % en los árboles. Las determinaciones de C realizadas en las muestras de forraje no presentan una diferencia significativa entre sí, por lo que todas se encuentran agrupadas en un solo grupo; todas las concentraciones obtenidas cumplen con lo establecido ya que su porcentaje es mayor al 34,6% y cercano o igual al 42%.

El nitrógeno es un elemento móvil, absorbido por las plantas en forma de nitratos y amoníaco, es un componente esencial debido a que forma parte de la clorofila y de las proteínas de las plantas, una concentración óptima de N está en el rango de 2% al 5% (Mengel y Kirkby, 2000: p.322). Los resultados obtenidos no presentan diferencia significativa entre sí (tabla 6-3), las muestras FO2, F03, F04 y F07 tienen una concentración inferior al 2%, las 3 muestras restantes cumplen con el valor establecido

en bibliografía, De estos resultados se deduce que existe una deficiencia de N en el forraje, por tal motivo en ciertos puntos de muestreo se observó una condición denominada clorosis, que es el amarillamiento de la planta por falta de clorofila, además el tamaño del forraje en estos puntos era pequeño. Una de las causas para la falta de N en el forraje en los puntos mencionados se puede deber a un retardo en la transformación de N orgánico a N mineral el cual es absorbido por la planta, este proceso llamado mineralización depende de la humedad, temperatura y pH, siendo el rango de pH ligeramente ácido o neutro el óptimo, los suelos donde se encuentran las muestras F02 y F03 presentan un pH moderadamente ácido por lo que disminuye la absorción de N (Mengel y Kirkby, 2000: p.322).

### **3.8.7. Resultados de Metales Pesados en forraje**

La Norma Técnica Ecuatoriana del Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN-CODEX 193 (2013) no establece los límites máximos de concentración de plomo, cadmio, mercurio, arsénico y selenio en forraje, por ello se tomara como referencia El Acuerdo Ministerial 097 Anexo 2 (2015) - Criterios de calidad del agua para consumo humano y doméstico, donde establece que los límites de concentración de plomo, cadmio, mercurio, arsénico y selenio son de 0,01; 0,02; 0,006; 0,1 y 0,01 ppm (mg/Kg) respectivamente.

Las concentraciones de selenio en las muestras de forraje F03, F04, F06 y F07 (tabla 7-3) superan el límite máximo permisible establecido por la norma ambiental ecuatoriana de agua, mientras que las muestras restantes presentan una concentración por debajo del límite de detección del método. Por su parte las concentraciones de arsénico a pesar de encontrarse por debajo de límite de detección del método no superan el límite máximo permisible establecido por la norma ambiental ecuatoriana de agua. En cuanto al plomo, cadmio y mercurio las concentraciones obtenidas se encuentran por debajo del límite de detección del método aplicado, y al no obtener valores numéricos como tal no se puede realizar un análisis comparativo con los límites máximos permisibles establecidos por la normal ambiental nacional.

### **3.9. Resultados del análisis fisicoquímico de la leche**

En la tabla 8-3 se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados en las muestras de leche cruda de la parroquia Bilbao.

**Tabla 8-3:** Análisis fisicoquímicos de la leche cruda.

Muestra	Dr	MG	AT	ST	SNG	Cenizas	PC	PR	Re	La	AA	pH	Sa	CE
	(g)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(°C)	(%)	(Horas:min)	(%)	(%)		(%)	(S/m)
<b>L01</b>	1,030	4,0533 c	0,1400 c	12,5600 d	8,5067 c	0,7600 c	-0,5500 d	3,1033 a	4:36	4,6833 c	0	6,6567 a	0,70	4,6833 c
<b>L02</b>	1,030	3,8300 c	0,1467 cd	12,6833 d	8,8533 d	0,7800 d	-0,5700 c	3,2300 a	2:45	4,8767 d	0	6,7100 ab	0,73	4,4933 b
<b>L03</b>	1,030	4,9233 d	0,1500 cd	14,1600 e	9,2367 e	0,7400 b	-0,6100 a	3,4633 b	4:16	5,3033 f	0	6,7567 ab	0,73	3,6433 a
<b>L04</b>	1,030	3,5400 b	0,0967 a	11,9600 b	8,4000 b	0,7933 e	-0,5333 e	3,0667 a	4:36	4,6267 b	0	6,7667 b	0,69	5,2367 d
<b>L05</b>	1,030	3,8600 c	0,1533 d	12,7333 d	8,8733 d	0,7800 d	-0,5700 c	3,2367 a	3:16	4,8867 d	0	6,6967 ab	0,73	4,4567 b
<b>L06</b>	1,030	3,3333 b	0,1100 b	11,5800 a	8,2467 a	0,7967 e	-0,5200 f	3,1200 a	4:36	4,5367 a	0	6,9167 c	0,68	5,3133 d
<b>L07</b>	1,036	2,7800 a	0,2233 e	12,1700 c	9,3900 f	0,7167 a	-0,6000 b	3,4433 b	3:30	5,1667 e	0	6,7700 b	0,77	5,8567 e
<b>F-ANOVA</b>		141,343 ***	257,667 ***	262,951 ***	3033,886 ***	91,389 ***	688 ***	16,101 ***		3158,292 ***		13,772 ***		561,401 ***

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

L= Muestra de leche, Dr= Densidad Relativa, MG= Materia Grasa, AT= Acidez titulable, ST= Sólidos Totales, SNG= Sólidos no grasos, Ce= Cenizas, PC= Punto de congelación, PR= Proteínas, Re= Reductasa, La= Lactosa, AA= Adición de agua, pH= Potencial de hidrógeno, Sa= Sales, CE= Conductividad eléctrica

### **3.9.1. Densidad relativa**

La densidad relativa ( $D_r$ ) de la leche es un parámetro importante para determinar la relación peso volumen, además la variación de densidad se encuentra relacionada con el porcentaje de grasa y sólidos no grasos (SNG), es decir a mayor cantidad de MG la densidad va a ser menor y a mayor cantidad de SNG la densidad va a ser mayor; cabe mencionar que la densidad también depende de otros factores como la temperatura, agitación y homogenización (Parmar, et al, 2020). La normativa ecuatoriana INEN 9: 2012 para leche cruda establece como valor mínimo de densidad (a 20 °C) 1.028 g/cm<sup>3</sup> y como máximo 1.032 g/cm<sup>3</sup>.

Todas las muestras de leche analizadas (tabla 8-3) cumplen con el rango  $D_r$  establecido por la norma, a excepción de la muestra L07 que presenta un  $D_r$  ligeramente superior al máximo establecido, con un valor de 1,036 g/cm<sup>3</sup> esto se debe al % elevado de SNG.

Además, la densidad es utilizada para verificar si se ha añadido agua o algún sólido en la leche, al estar los resultados dentro del parámetro establecido se deduce que la leche no ha sufrido ningún proceso de adulteración lo cual se corrobora con los análisis de adición de agua, punto de congelación y adición de almidones.

### **3.9.2. Materia grasa**

El contenido de materia grasa (MG) es importante porque una de sus principales funciones es el transporte de vitaminas liposolubles (D, E, K, A) lo cual fortalece el valor nutricional, además la leche se encuentra constituida por lípidos de cadena corta que son fáciles de absorber (Gigli, 2015, p.51).

La normativa ecuatoriana INEN 9: 2012 para leche cruda establece como valor mínimo de materia grasa 3%, los resultados obtenidos presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 %. Todas las muestras cumplen con lo mencionado en la normativa ecuatoriana > 3%, a excepción de la L07 que presenta una leve disminución, los motivos que afectan el descenso del contenido de grasa es una fermentación rumial alterada, la cual genera un isómero de ácido linoleico conjugado (CLA), siendo este un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos en la glándula mamaria. Esta alteración es causada por la dieta del ganado vacuno basada en concentrados que tiene en su composición un elevado contenido de carbohidratos no estructurales de fácil asimilación por el rumiante.

### **3.9.3. Acidez titulable**

La acidez titulable (AT) es un método cuantitativo usado en la evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de la leche, este se fundamenta en determinar el contenido de ácido láctico en una muestra cuando se titula con una solución de NaOH 0,1N y con ayuda del indicador fenolftaleína. Normalmente la leche no contiene ácido láctico, sin embargo, por acción bacteriana la lactosa se fermenta a ácido láctico y otros componentes que aumentan la acidez (López y Barriga, 2016: p.17). La NTE INEN 9:2012 establece el % de acidez titulable como ácido láctico del 0,13 al 0,17 %, dichos valores provienen de la caseína, sustancias minerales, iones fosfatos, citratos, ácidos orgánicos, entre otros (Baroni et al., 2017, p.427).

Los resultados de acidez titulable de las muestras de leche (tabla 8-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 %. El porcentaje de acidez titulable del grupo “c y d” se encuentra dentro del rango normal establecido por la norma, mientras que el porcentaje de acidez del grupo “a y b” presenta una concentración ligeramente baja respecto al nivel óptimo, los valores se encuentran entre 0,09 y 0,11 % y el grupo “e” presenta una acidez por encima del límite máximo. Dado que la mayoría de las muestras presentan una acidez dentro del rango normal, la leche presenta una calidad aceptable.

### **3.9.4. Sólidos totales**

La sumatoria de los porcentajes de MG y los sólidos no grasos (proteína, lactosa y sales minerales) da como resultado el contenido de sólidos totales (ST). Los resultados obtenidos (tabla 8-3) presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 %, cumpliendo con los requisitos establecidos en los parámetros fisicoquímicos de la norma INEN 9, donde se menciona que el valor mínimo es 11,2 %.

### **3.9.5. Sólidos no grasos**

Los sólidos no grasos (SNG) están conformados por la sumatoria de proteínas, lactosa y sales minerales. Los resultados de los SNG (tabla 8-3) presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 %, estos resultados obtenidos cumplen con los requisitos establecidos en los parámetros fisicoquímicos de la norma INEN 9, donde se establece que el valor mínimo es 8,2%.

### **3.9.6. Cenizas**

El porcentaje de ceniza es un parámetro que representa el contenido total de minerales que se obtiene luego de incinerar la materia orgánica de la leche (Chacón, 2017: p.35).

Los minerales forman parte de la leche en una proporción muy pequeña del 0,5 – 1 %. Los minerales se diferencian en macro elementos, sales mayoritarias constituidas por cloruros, fosfatos y citratos de potasio, calcio, sodio y magnesio, y oligoelementos que dependen de la alimentación del ganado, medio ambiente, etc. Entre ellos están el aluminio, zinc, hierro, cobre, manganeso, entre otros (López y Barriga, 2016: p.11). La normativa ecuatoriana INEN 9:2012 para leche cruda establece como valor mínimo de ceniza 0,65 %.

Todas las muestras analizadas cumplen con el % de ceniza establecida en la norma, además presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 % Así también los resultados de ceniza se relacionan con el elevado % de sólidos no grasos.

### **3.9.7. Punto de congelación**

El punto de congelación (PC) es un parámetro utilizado para evaluar la calidad de la leche cruda y verificar si ha sufrido adulteración como la adición de agua, por tal motivo la norma INEN 9 establece como valor mínimo de PC  $-0.536\text{ }^{\circ}\text{C}$  y como valor máximo  $-0.512\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los resultados obtenidos en los análisis de leche de la parroquia Bilbao presentan una diferencia significativa entre sí, con un nivel de confianza del 99,9 %; tienen como mínimo  $-0.6100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y como máximo  $-0.520\text{ }^{\circ}\text{C}$  (tabla 8-3), por tal motivo la leche analizada no presenta adulteración, debido a que el agua tiene un punto de congelación de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la leche al contener solutos tales como lactosa y sales hacen que el punto de congelación de esta sea menor en comparación con el agua. Además, al adicionar agua se diluyen los solutos haciendo que el PC se aproxime al del agua, por el contrario, los valores obtenidos de las muestras de Bilbao se alejan de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Bath, 1984).

### **3.9.8. Proteínas**

El contenido de proteína en la leche es heterogéneo ya que resulta de una mezcla de varias proteínas (alfa, beta, kappa y gamma caseínas,  $\alpha$ -lactoalbúminas,  $\beta$ -lactoglobulinas, seroalbúminas e inmunoglobulinas), enzimas y trazas de nitrógeno no proteico. Aproximadamente el 3,5% del peso

de la leche es proteína y constituye el 38% del total de SNG. Los valores varían según la raza del animal y son directamente proporcional al contenido de grasa (Chacón, 2017, p.31). La NTE INEN 9: 2012 establece un mínimo de 2,9 % de proteínas.

Todos los grupos de las muestras de leche analizadas cumplen con el % de proteína establecido por la norma, los valores se encuentran entre el 3.06 y 3.46 %, superando el valor indicado.

### **3.9.9. Ensayo de reductasa**

El ensayo de reductasa es utilizado para evaluar indirectamente el grado de desarrollo microbiano en la leche cruda, los microorganismos elaboran enzimas reductasas capaces de modificar el potencial de óxido reducción. El azul de metileno es capaz de decolorarse al cambiar de su forma oxidada a su forma reducida. Cabe mencionar, que la duración del proceso decoloración o reducción es inversamente proporcional al número de microorganismos presentes, sin embargo, existen algunos microorganismos capaces de reducir más rápido el azul de metileno que otros (García et al., 2014, p.2; NTE INEN 18).

Basados en la tabla de Clasificación de la Leche Cruda acorde al “TRAM” (Tiempo de reducción del azul de metileno), podemos decir que la leche producida en la parroquia Bilbao está en la categoría “B” Regular (2-5 horas), cumpliendo con el límite establecido por la NTE INEN 9 y por ende es aceptada para ser procesada.

### **3.9.10. Lactosa**

La lactosa constituye el principal componente de la leche después del agua, es un carbohidrato que solo se encuentra en la leche disuelta y uniformemente distribuida. En promedio se encuentra en un 4 - 5% y varía de acuerdo la raza del animal, factores ambientales y fisiológicos (Uscanga et al., 2019: p.359).

Todas las muestras analizadas presentan una cantidad óptima de lactosa de acuerdo a lo mencionado por Uscanga et al (2019), los valores obtenidos van desde 4,53% hasta 5,30 %.

### **3.9.11. Adición de agua**

La adición de agua en la leche es la forma más simple de adulteración, diluye los solutos, reduce el valor nutricional y es fuente de contaminación microbiana. Este análisis se confirma con el punto crioscópico, densidad y composición bromatológica, pues la adición de agua es inversamente

proporcional a los parámetros mencionados (Wing Ching y Mora, 2019, pp.313-314). Ninguna muestra analizada presenta adición de agua, lo que se corrobora con los datos de densidad, punto crioscópico y componentes bromatológicos.

### **3.9.12. pH**

El potencial de hidrógeno (pH) es una medida que se utiliza para determinar la acidez o alcalinidad de una sustancia en base a la concentración de iones hidrógeno, generalmente la leche presenta una acidez ligera con valores que oscilan entre 6,6 y 6,8; valores superiores por lo general se observa en leches mastíticas, mientras que valores inferiores indican presencia de calostro o contaminación microbiológica. El electrodo del pH-metro usado para la medición es sensible a los iones hidrógeno proveniente de ácidos orgánicos, anhídrido carbónico, ácido cítrico, fosfatos, etc., y traduce la cantidad de estas sustancias en una lectura potenciométrica (López y Barriga, 2016: p.11).

Todos los grupos de las muestras de leche analizadas presentan un pH dentro del rango normal, a excepción del grupo “c” que presenta un pH levemente incrementado

### **3.9.13. Sales**

Las sales mayoritarias de la leche están constituidas por cloruros, fosfatos y citratos de potasio, calcio, sodio y magnesio, siendo además una fuente importante de minerales. Las sales están presentes en un porcentaje de 0,7 a 0,8 % (Chacón, 2017, p.63). Todos los grupos de las muestras de leche analizadas presentan un porcentaje de sales dentro del rango normal establecido por Chacón (2017), a excepción de la muestra L04 y L06 que presentan un porcentaje de sales levemente inferior respecto al rango de referencia.

### **3.9.14. Conductividad eléctrica**

La conductividad eléctrica (CE) es usada como un indicador de mastitis, el aumento de la CE en la leche se debe al mayor contenido de electrolitos tales como el sodio y cloro como consecuencia de la lesión del tejido glandular. La conductividad en la leche se encuentra normalmente entre 4,0 y 5,0 S/m (Hanna Instruments, 2018). Los resultados de conductividad eléctrica de las muestras de leche (tabla 8-3), presentan una diferencia significativa entre sí con un nivel de confianza del 99,9 %. La CE del grupo “b y c” se encuentra dentro del rango normal, el grupo “d y e” presenta una CE

superior al límite máximo, y el grupo “a” presentan una CE inferior al límite mínimo. Este aumento y disminución de CE se relaciona con los niveles altos y bajos de sales que presentan los mismos grupos. En general con una media de 4,6 S/m los resultados obtenidos indican un contenido adecuado de sales minerales disueltas en la fracción libre de agua.

### 3.10. Resultados de análisis cualitativos de la calidad de la leche

En la tabla 9-3 se muestran los resultados de los análisis cualitativos de la calidad realizados en las muestras de leche cruda de la parroquia Bilbao; tales como reacción de la estabilidad proteica, presencia de conservantes, neutralizantes y adulterantes, estos tres últimos generalmente son adicionados en la leche para enmascarar una elevada acidez, resultado de una deficiente higiene en el proceso productivo o para reestablecer algunas características fisicoquímicas de la leche (Andrade et al., 2017). La Normativa ecuatoriana menciona que el resultado del análisis para estos adulterantes debe ser negativo ya que si son adicionados se degrada la calidad de la leche.

**Tabla 9-3:** Resultados de los ensayos cualitativos para la determinación de la calidad de la leche.

Muestra	Estabilidad proteica	Presencia de conservantes			Presencia de neutralizantes		Presencia de adulterantes
		CH <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Cloro, hipocloritos, cloraminas y ClO <sub>2</sub>	Prueba de la alizarina	Adición de orina	Detección de almidón
L01	-	-	-	-	-	-	-
L02	-	-	-	-	-	-	-
L03	-	-	-	-	-	-	-
L04	-	-	-	-	-	-	-
L05	+	-	-	-	-	-	-
L06	-	-	-	-	-	-	-
L07	-	-	-	-	-	-	-

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

L= Muestra de leche, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= Peróxido de hidrógeno, ClO<sub>2</sub>= Dióxido de cloro, CH<sub>2</sub>O=Formaldehído

### ***3.10.1. Estabilidad proteica***

De todas las muestras analizadas sola una resultó ser positiva, evidenciada por la formación de coágulos, las 6 muestras restantes fueron negativas; al comparar los resultados con los requerimientos de la norma NTE INEN 9: 2012, podemos decir que la gran mayoría de muestras cumplen con la normativa debido a que no formaron coágulos al reaccionar con el alcohol, además nos sugiere que la leche presenta estabilidad frente a procesos térmicos tales como la pasteurización. El resultado positivo se pudo dar por diversos motivos como la raza, composición, estado nutricional y de lactancia de la vaca o procesos de acidificación por microorganismos propios del proceso de ordeño o por contaminación cruzada (Ariza et al., 2007); cabe mencionar que la muestra L05 presenta un pH y acidez titulable cercano al límite máximo permisible.

### ***3.10.2. Presencia de conservantes***

Los conservantes son añadidos a la leche para incrementar el periodo de vida útil, con el objetivo de inhibir el crecimiento bacteriano y evitando así la descomposición rápida. Se determinó de forma cualitativa la presencia de conservantes como el formaldehído, peróxido de hidrógeno, cloro, hipocloritos, cloraminas y dióxido de cloro, obteniendo que el 100% de las muestras analizadas no presentan estos conservantes, cumpliendo así con lo mencionado en la normativa ecuatoriana INEN 9:2012.

### ***3.10.3. Presencia de neutralizantes***

Estas sustancias tienen como función modificar la acidez en la leche, enmascarando de esta manera una elevada cantidad de ácido láctico (Andrade et al., 2017). Para la identificación de neutralizantes se utilizó la prueba de la alizarina y la de pupo, esta última sirve para identificar la presencia de orina; dando como resultado que el 100% de las muestras analizadas no presentan la adición de neutralizantes tal como se menciona en la NTE INEN 9:2012.

### ***3.10.4. Presencia de adulterantes***

El almidón es añadido en la leche para reestablecer los valores normales de densidad cuando se ha añadido agua, provocando una disminución de la composición nutricional (Calderón et al., 2013). El

100 % de las muestras de leche analizadas de la parroquia Bilbao dieron un resultado negativo en la prueba de detección de almidones cumpliendo así con la normativa ecuatoriana INEN 9:2012.

### 3.11. Resultados de Metales pesados en la leche

La Norma Técnica Ecuatoriana del Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 9 (2012) establece que el límite máximo de concentración de plomo que debe cumplir la leche cruda de vaca es de 0,02 ppm (mg/Kg). Esta norma no establece los límites máximos de concentración para otros contaminantes como cadmio, mercurio, arsénico y selenio.

El Acuerdo Ministerial 097 Anexo 2 (2015), que regula los criterios de calidad del agua para consumo humano y doméstico, establece que los límites de concentración de metales pesados para cadmio, mercurio, arsénico y selenio son de 0,02; 0,006; 0,1 y 0,01 ppm (mg/Kg) respectivamente.

Los resultados de las concentraciones de plomo, cadmio, mercurio, y selenio de las muestras de leche se encuentran por debajo del límite de detección del método aplicado, y al no obtener valores numéricos como tal no se puede realizar un análisis comparativo con los límites máximos permisibles establecidos por la norma ambiental nacional. Mientras que las concentraciones de arsénico a pesar de encontrarse por debajo de límite de detección del método no superan el límite máximo permisible establecido por la norma ambiental ecuatoriana de agua.

**Tabla 10-3:** Resultados de metales pesados en la leche.

Muestra	Pb	Cd	Hg	As	Se
	(ppm)	(ppm)	(ppb)	(ppb)	(ppb)
L01	< 4	< 0,2	< 40	<30	<120
L02	< 4	< 0,2	< 40	<30	<120
L03	< 4	< 0,2	< 40	<30	<120
L04	< 4	< 0,2	< 40	<30	<120
L05	< 4	< 0,2	< 40	<30	<120
L06	< 4	< 0,2	< 40	<30	<120
L07	< 4	< 0,2	< 40	<30	<120

Realizado por: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

L= Muestra de leche, Pb= Plomo, Cd= Cadmio, Hg= Mercurio, As= Arsénico, Se= Selenio

### 3.12. Resultados de los Factores de Bioconcentración, Translocación y Biotransferencia

**Tabla 11-3:** Resultados de los factores de bioconcentración, translocación, y biotransferencia.

	<b>Pb</b>			<b>Cd</b>			<b>Hg</b>			<b>As</b>			<b>Se</b>		
	<b>BCF</b>	<b>TF</b>	<b>BTF</b>												
<b>P01</b>	0,108	1,28	3,99E-07	1,000	1,000	1,90E-08	1,000	1,000	3,90E-09	1,365	1,000	2,90E-09	1,060	0,944	4,98E-09
<b>P02</b>	1,000	0,004	3,99E-07	24,50	1,000	1,90E-08	1,000	1,000	3,90E-09	0,188	1,000	2,90E-09	1,170	0,840	1,20E-05
<b>P03</b>	1,000	1,000	3,99E-07	1,000	1,000	1,90E-08	1,000	1,000	4,81E-10	0,209	1,000	2,90E-09	1,356	0,939	1,20E-05
<b>P04</b>	1,212	0,825	3,99E-07	1,000	1,000	1,90E-08	0,264	3,786	2,40E-10	0,239	1,000	2,90E-09	3,411	0,746	1,20E-05
<b>P05</b>	1,000	1,000	3,99E-07	1,000	1,000	1,90E-08	1,000	1,000	3,90E-09	0,267	1,000	2,90E-09	1,190	0,618	4,64E-09
<b>P06</b>	1,000	1,000	3,99E-07	1,000	1,000	1,90E-08	1,000	1,000	2,40E-10	0,675	1,000	2,90E-09	1,916	0,719	6,23E-09
<b>P07</b>	64,49	1,92	3,99E-07	1,000	1,000	1,90E-08	0,127	7,873	7,77E-11	0,477	1,000	2,90E-09	2,509	0,875	5,72E-09

**Realizado por:** Albán, T; Ruiz, S. 2021.

**P=** Punto de muestreo, **BCF=** Factor de bioconcentración, **TF=** Factor de translocación, **BTF=** Factor de biotransferencia, **Pb=** Plomo, **Cd=** Cadmio, **Hg=** Mercurio, **As=** Arsénico, **Se=** Selenio

Los factores de bioconcentración, translocación y biotransferencia se utilizaron para determinar la presencia de metales pesados en la cadena alimentaria de la leche de vaca de la parroquia Bilbao.

El factor de bioconcentración (BCF) permite evaluar la capacidad que tiene la planta para acumular en la raíz el metal respecto a la concentración del mismo en el suelo, se dice que cuando la planta tiene un  $BCF > 1$  es hiperacumuladora y cuando el  $BCF < 1$  es excluyente. El factor de translocación (TF) determina la capacidad de absorción del metal en los órganos vegetativos a partir de la concentración del mismo en la raíz, se dice que cuando la planta tiene un  $TF > 1$  presenta un proceso eficiente de transporte del metal mientras que cuando el  $TF < 1$  el transporte es ineficaz. Finalmente, el factor de biotransferencia (BTF) evalúa la transferencia del metal desde la planta hacia la leche del animal (Castro et al., 2018: p.472).

### **3.12.1. Factor de bioconcentración (BCF)**

#### **3.12.1.1. Plomo**

El forraje del punto de muestreo P04 y P07 presentan un  $BCF > 1$ , que indican que la planta es hiperacumuladora de plomo en las raíces, el forraje del punto de muestreo P01 en cambio presentan un  $BCF < 1$  indicando que la planta es excluyente, y el forraje del punto de muestreo P02, P03, P05 y P06 presentan un  $BCF = 1$  que indican que el vegetal se encuentra en un estado neutral.

#### **3.12.1.2. Cadmio**

El forraje del punto de muestreo P02 presentan un  $BCF > 1$ , que indica que la planta es hiperacumuladora de este metal en las raíces, mientras que los puntos de muestreo restantes presentan un  $BCF = 1$  que indica que el vegetal se encuentra en un estado neutral.

#### **3.12.1.3. Mercurio**

El forraje del punto de muestreo P04 y P07 presentan un  $BCF < 1$ , que indican que la planta es excluyente, mientras que los puntos de muestreo restantes presentan un  $BCF = 1$  que indica que el vegetal se encuentra en un estado neutral.

#### 3.12.1.4. *Arsénico*

El forraje del punto de muestreo P01 presenta un  $BCF > 1$ , que indica que la planta es hiperacumuladora de arsénico en las raíces, los puntos de muestreo restantes en cambio presentan un  $BCF < 1$  indicando que la planta es excluyente.

#### 3.12.1.5. *Selenio*

El forraje de todos los puntos de muestreo presenta un  $BCF > 1$ , que indica que las plantas son hiperacumuladoras de selenio en las raíces.

### 3.12.2. **Factor de translocación (TF)**

#### 3.12.2.1. *Plomo*

El forraje del punto de muestreo P01 y P07 presentan un  $TF > 1$ , que indica que la planta tiene un proceso eficiente de transporte del plomo y que la parte aérea lo está absorbiendo, el forraje del punto de muestreo P02 y P04 en cambio presentan un  $TF < 1$  indicando que la planta tiene un transporte ineficaz, y el forraje del punto de muestreo P03, P05, y P06 presentan un  $TF = 1$  que indica que el vegetal se encuentra en un estado neutral.

#### 3.12.2.2. *Cadmio*

El forraje de todos los puntos de muestreo presenta un  $TF = 1$  que indica que el vegetal se encuentra en un estado neutral para el transporte de este metal.

#### 3.12.2.3. *Mercurio*

El forraje del punto de muestreo P04 y P07 presentan un  $TF > 1$ , que indican que la planta tiene un proceso eficiente de transporte de mercurio y que la parte aérea lo está absorbiendo, mientras que el forraje de los puntos de muestreo restantes presenta un  $TF = 1$  que indica que el vegetal se encuentra en un estado neutral para el transporte de este metal.

#### 3.12.2.4. *Arsénico*

El forraje de todos los puntos de muestreo presenta un  $TF= 1$  que indica que el vegetal se encuentra en un estado neutral para el transporte de este metal.

#### 3.12.2.5. *Selenio*

El forraje de todos los puntos de muestreo presenta un  $TF < 1$  indicando que la planta tiene un transporte ineficaz de este metal.

#### 3.12.3. *Factor de biotransferencia (BTF)*

Los resultados del factor de biotransferencia de los metales pesados expuestos a continuación se encuentran ubicados en forma ascendente de tal modo que se observe quien presenta mayor transferencia a la leche del ganado vacuno.

En todos los puntos de muestreo los valores de biotransferencia de plomo, cadmio y arsénico obtenidos fueron  $3,99E-07$ ;  $1,90E-08$  y  $2,90E-09$  respectivamente.

Para el mercurio se obtuvieron diferentes valores de biotransferencia en cada punto de muestreo, en el punto de muestreo P01, P02 y P05 el valor fue de  $3,90E-09$ , en el punto de muestreo P04 y P06 el valor fue de  $2,40E-10$ , en el punto de muestreo P03 el valor fue de  $4,81E-10$  y en el P07 el valor fue de  $7,70E-11$ .

Para el selenio se obtuvieron también diferentes valores de biotransferencia en cada punto de muestreo, en el punto de muestreo P02, P03 y P04 se obtuvieron valores de  $1,20E-05$ , en el punto de muestreo P04 el valor fue de  $4,64E-09$ , en el P01 el valor fue  $4,98 E-09$ , en el P07 el valor fue  $5,72E-09$  y en el P06 el valor fue de  $6,23E-09$ .

#### 3.13. **Resultados de la evaluación de riesgos para la salud**

Los valores obtenidos de metales pesados (Pb, Cd, Hg, As y Se) en la leche fueron inferiores a la sensibilidad del método utilizado, sin embargo, el equipo pudo detectar algunas concentraciones bajas de Hg y Se siendo el promedio de sus concentraciones  $0,0022$  ppm y  $0,005$  ppm respectivamente.

Los balances de alimentos aplicados en este estudio suponen un consumo uniforme sin tomar en cuenta las diferencias socioeconómicas y culturales, además se asume que la disponibilidad es igual al consumo, sin conocer si existen desperdicios o deterioro de la leche, por lo que se puede suponer que la cantidad consumida probablemente sea menor que el dato establecido en el balance de alimentos. Los resultados de THQ, HI y EDI deben ser menores a 1 para no suponer un riesgo de efectos no cancerígenos (Antoine et al., 2017).

El resultado de THQ para Hg es 0,01 mientras que para Se es de 0,14; los dos valores son menores 1, el HI evalúa el efecto acumulativo del consumo de varios metales potencialmente peligrosos, al sumar los valores de THQ de Se y Hg se obtiene un valor de 0,15; el EDI se evalúa frente a la dosis de referencia oral, el resultado obtenido para Hg es 0,001 y 0,24 para Se. De todos estos resultados obtenidos se deduce que la leche analizada de Bilbao no presenta un riesgo no cancerígeno para la salud de la población.

### 3.14. Socialización de resultados

El día sábado 04 de septiembre del 2021 se realizó la socialización de los resultados en la sede del GAD Parroquial de Bilbao, junto a las autoridades de la parroquia e integrantes del grupo de investigación GAIBAQ.



**Figura. 1-3.** Socialización de resultados.

Fuente: Albán, T; Ruiz, S. 2021.

## CONCLUSIONES

- Las concentraciones de Pb, Cd y Hg en las muestras de suelo fueron menores a 10; 0,5 y 100 ppm respectivamente, mientras que las concentraciones de As presentaron valores entre 54,95 - 398,86 ppb y las de Se valores <300 – 407,69 ppb. En las muestras de forraje las concentraciones de Pb, Cd y Hg fueron inferiores a 10; 0,5 y 100 ppm respectivamente, mientras que los valores de As fueron menores a 75 ppb y las de Se fueron <300 – 407,69 ppb. Por su parte en la matriz leche las concentraciones de plomo, cadmio, mercurio, arsénico y selenio fueron menores 4 ppm; 0,2 ppm; 40 ppm; 30 ppb y 120 ppb respectivamente. De esta forma se concluye que las concentraciones de MP en los suelos de la zona de estudio se encuentran por debajo de límite máximo permisible que establece la norma ambiental ecuatoriana; así también las concentraciones de arsénico en las muestras de forraje y leche a pesar de encontrarse por debajo del límite de detección del método no superan el límite máximo establecido por la norma ambiental nacional. Por otro lado, varias muestras de forraje presentaron concentraciones de selenio por encima del límite máximo permisible establecido por la normativa ambiental nacional. Las concentraciones de los metales restantes no pudieron ser comparadas con la normativa debido a que no se obtuvieron valores numéricos como tal.
- Los suelos de la Parroquia Bilbao presentan características similares de adsorción debido a que es una zona afectada por la actividad del volcán Tungurahua y por ende el suelo posee una gran cantidad de ceniza volcánica. De manera general, el suelo analizado presenta una capacidad adsorptiva aceptable frente a los metales pesados, debido a que los valores obtenidos de pH, CE y densidad están dentro o próximos al rango especificado en el Acuerdo Ministerial 097, sin embargo, el nivel de materia orgánica es inferior a lo requerido por lo que podría tener efectos sobre la correcta adsorción de metales. Además, el suelo analizado presenta mayor porcentaje de arena por lo que la textura predominante en los suelos de Bilbao es franco arenoso, por tener esta característica la concentración de C es baja, sin embargo, los niveles de P, K y N en el suelo son adecuados. El forraje analizado presenta una CE elevada en comparación con el suelo por ende las concentraciones de Na y cloruros son altas, además existe una deficiencia de P y N, los nitratos tienen un leve incremento en su concentración, pero los demás nutrientes analizados tienen niveles óptimos en el forraje.

- Los factores de bioconcentración (BCF), translocación (TF) y biotransferencia (BTF) se calcularon para cada metal a partir de las concentraciones en suelo, raíz, forraje y leche. Se encontró un BCF > 1 con orden decreciente de la siguiente manera: Se, Pb, Cd, As, Hg, indicando que las raíces de los forrajes estudiados son un medio de acumulación de MP. Se encontró un TF > 1 con orden decreciente de la siguiente manera: Hg, Pb, Cd, As y Se lo que indica la existencia de una gran movilidad de MP en la planta y se halló un BTF de 1,46E-07; 3,99E-07; 1,90E-08; 2,90E-09 y 7,45E-10 para Se, Pb, Cd, As Hg respectivamente donde el Se, Pb y Cd presentan una biotranferencia mayor.
- Se evaluó los parámetros de riesgo para la salud mediante el coeficiente de peligro objetivo (THQ), índice de peligro (HI) e ingesta diaria estimada (EDI) en la población de la parroquia Bilbao; concluyendo que las muestras de leche analizadas no presentan ningún riesgo de efectos no cancerígenos para la salud con respecto a selenio y mercurio, además no se supone un riesgo por efectos acumulativos para la salud.

## RECOMENDACIONES

- Para la medición de cadmio y plomo en biomasa y alimentos se recomienda utilizar equipos más sensibles como el horno de grafito en espectroscopia de absorción atómica o en su defecto la espectrometría masas por plasma acoplado inductivamente ICP-MS para la determinación de todos los metales.
- Realizar evaluaciones periódicas de la capacidad adsorptiva del suelo frente metales pesados, para de esta manera garantizar la seguridad alimentaria, además realizar un análisis de nutrientes para conocer si existen deficiencias o excesos en los cultivos.
- Los factores de bioconcentración (BCF), translocación (TF) y biotransferencia (BTF) son de gran ayuda para evaluar el paso de los contaminantes a través de la cadena trófica.
- Es importante realizar trabajos de investigación sobre contaminación con metales pesados en los diversos productos agrícolas cultivados en la zona para evaluar si existen riesgos para la salud de la población.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ACUERDO MINISTERIAL 097.** *Anexo 1 del libro VI del texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente: Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua.*

**ACUERDO MINISTERIAL 097.** *Anexo 2 del libro VI del texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente: Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados.*

**ACUÑA, Krupskaja.** Análisis de la ceniza volcánica del Tungurahua (granulométrico, de componente y químico) en la primera fase eruptiva de 2010 (Enero-Marzo) [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. 2017. p. 64. [Consulta: 02 junio 2021]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/18819>

**Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades.** ToxFAQs™ - Selenio (Selenium) [blog]. 2016. [Consulta: 13 de julio de 2021]. Disponible en [https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts92.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts92.html)

**AGRINOVASIENICE.** *¿Cómo entender la conductividad eléctrica de nuestro suelo?* [en línea]. España, 2014 [Consulta: 03 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://agrinova.com/noticias/como-entender-la-conductividad-electrica-de-nuestro-suelo/>

**ALBIONLABSERVICES.** *An interpretation of the forage mineral report* [en línea]. 2011. [Consulta: 02 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.albionlabservices.co.uk/wp-content/uploads/2011/09/E5-Interpretation-of-Forage-Mineral-Report.pdf>

**ANDRADE, Óscar; et al.** *Determinación de adulterantes en leche cruda de vaca en centros de acopio, medios de transporte y ganaderías de la provincia del Cañar, Ecuador.* [en línea]. Maskana, 2017. [Consulta: 24 de abril de 2021]. Disponible en: <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1507/1192>

**ANDRADES, Marisol; et al.** *Prácticas de edafología: métodos didácticos para análisis de suelos* [en línea]. La Rioja-España: Servicio de Publicaciones, 2015. [Consulta: 24 de abril de 2021]. ISBN

978-84-608-5117-2.

Disponible

en: <https://publicaciones.unirioja.es/catalogo/monografias/mdaa15.shtml>

**ANTOINE, Johann; et al.** "Assessment of the potential health risks associated with the aluminium, arsenic, cadmium and lead content in selected fruits and vegetables grown in Jamaica". *Toxicology Reports* [en línea], 2017, (4), pp. 181-187. [Consulta: 13 de julio de 2020]. ISSN 22147500. DOI 10.1016/j. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750017300161>

**AYALA, Jose; & ROMERO, Hugo.** "Presencia de metales pesados (arsénico y mercurio) en leche de vaca al sur de Ecuador". *Revista de Ciencias de la Vida* [en línea], 2013, (Ecuador) 17(1), pp. 36-46. [Consulta: 01 de agosto de 2020]. ISSN 1390-3799. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047401002>

**ARAF, Meshref; et al.** "Heavy metals and trace elements levels in milk and milk products". *Journal of food measurement and characterization* [en línea], 2014, 8 (4), pp. 381-388. [Consulta: 03 junio 2021]. ISSN 21934134. Disponible en: [https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-014-9203-6#:~:text=Pb%2C%20Cd%2C%20Zn%2C%20Cu,kg\)%20established%20by%20codex%20standar](https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-014-9203-6#:~:text=Pb%2C%20Cd%2C%20Zn%2C%20Cu,kg)%20established%20by%20codex%20standar)  
d

**ARIZA, Edgar.** Evaluación de la estabilidad proteica en la leche y su relación con la calidad microbiológica en los municipios de Tocancipa, Tabio Y Zipaquirá. [en línea] (Trabajo de titulación). Universidad de la Salle, Facultad de Zootecnia, Colombia. 2007. pp. 1-73. [Consulta: 24 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://docplayer.es/90041487-Evaluacion-de-la-estabilidad-proteica-en-la-leche-y-su-relacion-con-la-calidad-microbiologica-en-los-municipios-de-tocancipa-tabio-y-zipaquirá.html>

**BADUI, S.** *Química de los alimentos* [en línea]. 5ª ed. DF-México: Pearson Educación de México, S.A. de C.V., 2012. [Consulta: 09 noviembre 2020]. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Libro-Badui2006\\_26571.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Libro-Badui2006_26571.pdf)

**BARCHIESI, Gabriella; et al.** "Inestabilidad de la leche asociada a componentes lácteos y estacionalidad en vacas a pastoreo". *Pesquisa Agropecuária Brasileira* [en línea], 2007, 42 (12),

pp.1785-1791. [Consulta: 24 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/pab/a/s4QkkkYKCsTBhcCWckvmFDx/?format=pdf&lang=es>

**BARONI, María; et al.** *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016* [en línea]. Córdoba-Argentina, 2017. [Consulta: 22 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://cicytac.cba.gov.ar/wp-content/uploads/2018/03/AnalisisFisico-QuimicosSensoriales.pdf>

**BARRIO, Noelia.** Metales pesados en suelos y sus efectos sobre la salud [en línea] (Trabajo de fin de grado). Universidad Complutense, Facultad de farmacia, Madrid. 2017. pp. 1-20. [Consulta: 04 de julio 2020]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/55568/>

**Bath, D.** (1984). Ganado lechero, principios, prácticas, problemas y beneficios.

**BONADEO, Elena; et al.** *Sistema suelo-planta* [en línea]. Río Cuarto – Argentina: UniRío Editora, 2017. [Consulta: 03 de agosto de 2021]. Disponible en: <http://www.unirioeditora.com.ar/wp-content/uploads/2018/08/978-987-688-204-0.pdf>

**CALDERÓN, Alfonso; et al.** “ Determinación de adulterantes en leches crudas acopiadas en procesadoras de quesos en Montería (Córdoba)”. *Orinoquia* [en línea], 2013, vol.17 (2), pp.202-206. [Consulta: 17 de agosto de 2021]. ISSN 0121-3709. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-37092013000200007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092013000200007&lng=en&nrm=iso). ISSN 0121-3709

**CAMACHO, Jesús; et al.** “Evaluación de textura del suelo con espectroscopia de infrarrojo cercano en un oxisol de Colombia”. *Colombia Forestal* [en línea], 2017, (Colombia) 20 (1), pp. 5-18. [Consulta: 03 junio 2021]. ISSN 0120-0739 .Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4239/423949141001.pdf>

**CASAL, Jorge.** *Las plantas, entre el suelo y el cielo* [en línea]. Buenos Aires- Argentina: Eudeba, 2007 [Consulta: 02 agosto 2021].Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/esepoch/101393>

**CASTELANOS, Luz.** Determinación de metales pesados y evaluación de la biotransferencia de especies inorgánicas de arsénico en leche bovina cruda. [en línea] (Trabajo de titulación de posgrado). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas. México, 2015.

pp. 1-65 [Consulta: 03 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/11279/1/1080215187.pdf>

**CASTRO, Numa; et al.** "Metales pesados en leche de vacas alimentadas con alfalfa producida en suelos irrigados con aguas residuales en Puebla y Tlaxcala, México". *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* [en línea], 2018, (México) 9(3), pp. 466-485. [Consulta: 16 de junio de 2020]. ISSN 2448-6698. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242018000300466&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242018000300466&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

**CHACÓN, Francisco.** Evaluación de los análisis físico-químicos de la leche bovina [en línea] (trabajo de titulación). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador. 2017. [Consulta: 23 mayo 2021]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13538/1/UPS-CT006912.pdf>

**CODEX ALIMENTARIUS 193:1995.** *Norma general del codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos*

**CORRENDO, Adrián; & GARCÍA, Fernando.** "Concentración de nutrientes en planta como herramienta de diagnóstico: Cultivos extensivos". *International Plant Nutrition Institute* [en línea], 2014, (Argentina). [Consulta: 03 de agosto de 2021]. Disponible en: [http://lacs.ipni.net/ipniweb/region/lacs.nsf/0/DDBAEC0992C9039F852579B3005ACE5D/\\$FILE/A%2014.pdf](http://lacs.ipni.net/ipniweb/region/lacs.nsf/0/DDBAEC0992C9039F852579B3005ACE5D/$FILE/A%2014.pdf)

**DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE AUSTRALIA.** *Soil organic carbón* [en línea]. 2013. [Consulta: 15 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.agric.wa.gov.au/sites/gateway/files/2.4%20Soil%20organic%20carbon.pdf>

**DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA (USDA).** *Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo* [en línea]. Estados Unidos, 1999. [Consulta: 15 de julio de 2020]. Disponible en: [https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_DOCUMENTS/stelprdb1044786.pdf](https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/stelprdb1044786.pdf)

**EQUIPOS Y LABORATORIOS DE COLOMBIA.** *Potencial de hidrogeno* [en línea]. Colombia, 2011 [Consulta: 02 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/potencial-de-hidrogeno>

**ESPINOZA, Leo; et al.** “Como Interpretar los Resultados de los Análisis de Suelos”. *Journal Division of Agriculture* [en línea], 2018, (Estados Unidos de América) 7, p.3. [Consulta: 03 noviembre 2020]. ISSN 2118SP. Disponible en: <https://www.uaex.edu/publications/PDF/FSA-2118SP.pdf>

**FAO.** *El manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas* [en línea]. Departamento Central-Paraguay: FAO, 2013. [Consulta: 02 agosto 2021. Disponible en: <http://www.fao.org/3/i3361s/i3361s.pdf>

**GADM Penipe.** *Bilbao* [blog]. Penipe: GADM Penipe, 2016. [Consulta: 24 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://penipe.gob.ec/index.php/turismo/bilbao>

**GALÁN, Emilio; & ROMERO, Antonio.** "Contaminación de Suelos por Metales Pesados". *Revista de la sociedad española de mineralogía* [en línea], 2008, (10), pp. 48-60. [Consulta: 04 de julio de 2020]. ISSN 1885-7264. Disponible en: [http://www.ehu.eus/sem/macla\\_pdf/macla10/Macla10\\_48.pdf](http://www.ehu.eus/sem/macla_pdf/macla10/Macla10_48.pdf).

**GALLART, Fernando.** La conductividad eléctrica del suelo como indicador de la capacidad de uso de los suelos de la zona norte del Parque Natural de la Albufera de Valencia [en línea] (Trabajo de fin de grado). Universitat Politècnica de Valencia, Escola Tècnica Superior D'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural. Madrid, España. 2017. p. 25 [Consulta: 08 noviembre 2020]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/94368/GALLART%20-%20La%20conductividad%20el%C3%A9ctrica%20del%20suelo%20como%20indicador%20de%20la%20capacidad%20de%20uso%20de%20los%20suelo....pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**GARCÍA, Adriana; & QUINKE, Andrés.** “El Potasio (K) en la Producción de Cultivos de Invierno”. *Serie Actividades de Difusión* [en línea], 2012, (Argentina) (677), pp. [Consulta: 03 junio 2021]. Disponible en: <https://docplayer.es/15681096-El-potasio-k-en-la-produccion-de-cultivos-de-invierno.html>

**GARCÍA, Carlos; et al.** “Metales pesados y sus implicaciones en la calidad del suelo”. *Ciencia y Medio Ambiente*. [en línea], 2002, (México) 22 (3), p. 14. [Consulta: 03 junio 2021]. ISSN 84-699-7972-8 .Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/111812>

**GIGLI, Isabel.** *La buena leche: aspectos biológicos y su industrialización* [en línea]. Ituzaingó-Argentina: Maipue, 2015. [Consulta: 13 junio 2021]. Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/espoch/77317>

**GOETSCHER, L.** *Los Metales Pesados: un Desafío para la Inocuidad Alimentaria en el Ecuador* [en línea]. UDLA, 2018. [Consulta: de 26 mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.udla.edu.ec/wp-content/uploads/2019/02/Los-Metales-Pesados-un-Desaf%23U00edo-para-la-Inocuidad-Alimentaria-en-el-Ecuador-Lorena-Goetschel.pdf>

**GUPTA, I.C; et al.** *Standard Methods for Analysis of Soil Plant and Water* [en línea]. Daryaganj New Delhi-India: Scientific Publishers, 2012. [Consulta: 26 mayo 2021]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=bwQ5DwAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summy\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=bwQ5DwAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summy_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

**HACH LANGE GMBH.** *LCK 049 Orthophosphate* [blog]. 2019. [Consulta: 29 mayo 2021]. Disponible en: <https://aquaanalytics-tekhnika.ru/assets/products/87/hach-lck049-ortofosfat-metodika.pdf>

**HACH LANGE GMBH.** *LCK 153 Sulphate* [blog]. 2019. [Consulta: 29 mayo 2021]. Disponible en: <https://aquaanalytics-tekhnika.ru/assets/products/169/hach-lck153-sulfat-metodika.pdf>

**HACH LANGE GMBH.** *LCK 340 Nitrate* [blog]. 2019. [Consulta: 29 mayo 2021]. Disponible en: <https://aquaanalytics-tekhnika.ru/assets/products/129/hach-lck340-nitrat-metodika.pdf>

**HANNA INSTRUMENTS.** *Conductividad en Leche* [blog]. Chile: 14 de agosto, 2018. [Consulta: 26 mayo 2021]. Disponible en: <https://ww2.hannachile.com/blog/post/conductividad-en-leche#:~:text=Por%20lo%20tanto%2C%20si%20se,y%20desarrollo%20de%20la%20enfermedad>

**HERNÁNDEZ, Jorge; et al.** *Potasio* [blog]. 2010 [Consulta: 03 junio 2021]. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/~fertilidad/curso/docs/Potasio.pdf>

**INNOVATIONE AGROFOOD DESIGN POSTED.** *Fertilidad: textura y estructura del suelo* [blog]. España: Agricultura, Agronomía, Articles, 2 de diciembre, 2019. [Consulta: 03 junio 2021]. Disponible en: <https://innovatione.eu/2019/12/02/fertilidad-textura-estructura-del-suelo/>

**INSTITUTO GEOFÍSICO -EPN.** *Tungurahua* [en línea]. Ecuador, 2020 [Consulta: 24 de mayo de 2020]. Disponible en : <https://www.igepn.edu.ec/tungurahua>

**JÍMENEZ, R.** *Introducción a la contaminación de suelos* [en línea]. Madrid-España: Mundi-prensa, 2017. [Consulta: 04 de julio de 2020]. ISBN 9788484767893. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=iZg6DwAAQBAJ&pg=PA20&lpg=PA20&dq=contaminacion+del+suelo+International+Journal+of+Environmental+Research+and+Public+Health&source=bl&ots=i4QtUpZu0s&sig=ACfU3U1PbUw-kuuWktyk-\\_35oHIqvAz42Q&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiEs\\_DHgrTqAhUhmeAKHUTcCrsQ6AEwBXoECA0QAQ#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=iZg6DwAAQBAJ&pg=PA20&lpg=PA20&dq=contaminacion+del+suelo+International+Journal+of+Environmental+Research+and+Public+Health&source=bl&ots=i4QtUpZu0s&sig=ACfU3U1PbUw-kuuWktyk-_35oHIqvAz42Q&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiEs_DHgrTqAhUhmeAKHUTcCrsQ6AEwBXoECA0QAQ#v=onepage&q&f=false).

**KONIJNENBURG A.** *Agricultura Orgánica El suelo: sus componentes físicos* [en línea]. Río Negro-Argentina: Estación Experimental Agropecuaria, 2006. [Consulta: 03 junio 2021]. Disponible en: [https://www.ciaorganico.net/documypublic/498\\_script-mp-inta\\_material\\_didactico\\_nro\\_01\\_\(1\).pdf](https://www.ciaorganico.net/documypublic/498_script-mp-inta_material_didactico_nro_01_(1).pdf)

**LAMZ, Alexis; & GONZALEZ, María.** “La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata”. *Cultrop* [en línea]. 2013, (Cuba), vol.34 (4), pp.31-42. [Consulta: 2021-08-17], ISSN 0258-5936. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362013000400005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362013000400005)

**LE PENNEC, Jean-Luc; et al.** “Impact of tephra falls on Andean communities: The influences of eruption size and weather conditions during the 1999–2001 activity of Tungurahua volcano, Ecuador”. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* [en línea], 2012, (Francia) 217-218, pp. 91-103. [Consulta: 29 mayo 2021]. ISSN 03770273. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2011.06.011>

**LONDOÑO, Luis; et al.** " Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal". *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* [en línea], 2016, (14)2, pp. 145-153. [Consulta: 14 de julio de 2020]. ISSN 1909-9959. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n2/v14n2a17.pdf>

**LÓPEZ, Á & BARRIGA, D.** *La leche composición y características* [en línea]. Sevilla-España: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria

y Pesquera, 2016. [Consulta: 09 noviembre 2020]. Disponible en: <https://www.coursehero.com/file/48158097/La-leche-composicion-y-caracteristicaspdf/>

**MA, Qing; et al.** “Environmental risk assessment of metals in the volcanic soil of Changbai mountain”. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [en línea], 2019, (China) 16(11). pp. 1-17. [Consulta: 28 de mayo de 2020]. ISSN 16604601. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/11/2047/htm#:~:text=A large-scale volcanic eruption,%5B11%5D>

**MARTIN, Christoph.** “Chloride: from Nutrient to Toxicant”. *Plant and Cell Physiology* [en línea], 2018, 59, pp. 877–886. [Consulta: 28 de julio de 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy071>

**MARTÍNEZ, Andrés; & SÁNCHEZ, Juan.** “Efectos del nitrato en la alimentación de rumiantes”. *Sitio Argentino de Producción Animal* [en línea], 2007. [Consulta: 08 de agosto de 2021]. Disponible en: [https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/intoxicaciones/10-efectos\\_del\\_nitrato.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/intoxicaciones/10-efectos_del_nitrato.pdf)

**MARTÍNEZ, M.R.** *Análisis Instrumental. Espectrometría de Absorción Atómica (EAA)* [en línea]. 2020. Valencia, España. [Consulta: 2 de julio de 2020]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/138418>

**MENGEL, Konrad; & KIRKBY, Ernest.** *Principios de nutrición vegetal.* [en línea]. 4ª ed. Basilea-Suiza: EEA INTA Pergamino, 2000. [Consulta: 03 de agosto de 2021]. Disponible en: [https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/66737/mod\\_resource/content/2/PRINCIPIOS%20DE%20NUTRICI%C3%93N%20VEGETAL.pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/66737/mod_resource/content/2/PRINCIPIOS%20DE%20NUTRICI%C3%93N%20VEGETAL.pdf)

**MILIAN, Laura.** Influencia de la materia orgánica del suelo en el secuestro de carbono. biochar, una estrategia potencial [en línea] (Trabajo de fin de grado). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia. Madrid, España. 2015. pp. 9-11 [Consulta: 03 noviembre 2020]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/48810/1/LAURA%20MILIAN%20GAY%20%281%29.pdf>

**MILKOTRONIC Ltd.** *LACTOSCAN SP Analizador de Leche Pantalla LCD 4 líneas x 16 caracteres Caja de plástico Manual de Operaciones* [en línea]. Bulgaria: 2012. [Consulta: 29 mayo 2021]. Disponible en: [https://www.lactoscan.com/editor/ufo/manuals/SP/Lactoscan\\_SP\\_ES.pdf](https://www.lactoscan.com/editor/ufo/manuals/SP/Lactoscan_SP_ES.pdf)

**Ministerio de Agricultura.** *Es hora de unirnos y marcar la diferencia: inicia campaña de consumo de leche.* [en línea], 2018, (Ecuador). [Consulta: 28 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.agricultura.gob.ec/es-hora-de-unirnos-y-marcar-la-diferencia-inicia-consumo-de-leche/>

**MIXQUITITLA, Gabriela; & VILLEGAS, Óscar.** “Importancia de los fosfatos y fosfitos en la nutrición de cultivos”. *Acta Agrícola y Pecuaria* [en línea], 2016, (México) 2(3), pp. 55-61. [Consulta: 11 de agosto de 2021]. ISSN 2448-7090. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6201359>

**MOLINA, Andrea.** Selenio: Un elemento tóxico y esencial [en línea] (Trabajo de fin de grado). Universidad Complutense, España. 2019. [Consulta: 20 julio 2021]. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANDREA%20ESTEFANIA%20MOLINA%20MAI SINCHO.pdf>

**MOREANO, S.** *Análisis químico Instrumental I.* Riobamba-Ecuador: 2015, pp.11-213.

**MULLER, Cyril; et al.** “Temporal evolution of the magmatic system at Tungurahua Volcano, Ecuador, detected by geodetic observations”. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* [en línea], 2018, (Francia) 368, pp. 63-72. [Consulta: 29 mayo 2021]. ISSN 03770273. Disponible en: DOI 10.1016/j.jvolgeores.2018.11.004.

**MUÑOZ, Elizabeth; et al.** “EVALUACIÓN DEL ESTADO ACTUAL DEL NITRÓGENO EN EL ARREGLO SILVOPASTORIL ALISO (*Alnus jorullensis* H B & K) KIKUYO (*Pennisetum clandestinum* Hochst. ex Chiov.)”. *Ciencias agrícolas* [en línea], 2011, (Colombia) 28 (1), pp. 161 - 175. [Consulta: 29 julio de 2021]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5104120>

**NAVARRO, Julio; et al.** “Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas”. *Revista Científica de Ecología y Medio Ambiente* [en línea], 2007,

(España) 16 (2), p. 16. [Consulta: 03 junio 2021]. ISSN 1132-6344. Disponible en: <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/125>

**NEUBERG, Jurgen; et al.** “Understanding cyclic seismicity and ground deformation patterns at volcanoes: Intriguing lessons from Tungurahua volcano, Ecuador”. *Earth and Planetary Science Letters* [en línea], 2017, (Reino Unido) 482, pp. 193-200. [Consulta: 29 mayo 2021]. ISSN 0012821X. Disponible e: <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2017.10.050>

**NOLASCO, Juan.** Niveles de fósforo y su efecto en el rendimiento y calidad del cultivo de sandía (*Citrullus lanatus*) cv. black fire en cañete [en línea] (Trabajo de titulación). Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú. 2016. [Consulta: 03 junio 2021]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1978/F04-N6-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**NOVILLO, Indira; et al.** “Propiedades físicas del suelo en diferentes sistemas agrícolas en la provincia de Los Ríos, Ecuador”. *Revista Temas Agrarios* [en línea], 2018, (Ecuador) 23 (2), p.178. [Consulta: 02 junio 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.21897/rta.v23i2.1301>

**NTE INEN 9:2012.** *Leche cruda Requisitos*

**ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** *Contaminar nuestros suelos es contaminar nuestro futuro* [blog]. FAO, 2015 [Consulta: 13 de julio 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-stories/article/en/c/1126974/#:~:text=Soil%20pollution%20causes%20a%20chain%20reaction.&text=For%20example%3A%20polluted%20soil%20can,eat%20the%20plants%20and%20animals.>

**PARMAR, Puneet; et al.** “The Effect of Compositional Changes Due to Seasonal Variation on Milk Density and the Determination of Season-Based Density Conversion Factors for Use in the Dairy Industry”. *Foods* [en línea], 2020, 9 (8). [Consulta: 02 junio 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/foods9081004>

**PAYERAS, Antoni.** *Ácidos húmicos y Ácidos Fúlvicos* [blog]. Bonsai Menorca. [Consulta: 07 noviembre 2020]. Disponible en: <http://www.bonsaimenorca.com/articulos/articulos-tecnicos/acidoss-humicos-y-acidos-fulvicos/>

**PÉREZ, Fernando.** *Fisiología vegetal Parte III Nutrición mineral* [en línea]. Perú: Universidad Nacional de Ucayali, 2017. [Consulta: 12 de mayo de 2021]. Disponible en: <http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/3201/000026082L.pdf>

**POLO, María.** Análisis de concentración de arsénico en tres alimentos: papas, zanahoria, leche cruda producidas en las zonas afectadas por el volcán tungurahua (Mocha-Quero) [en línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. 2009. pp. 1-123. [Consulta: 24 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/202/1/56T00174.pdf>

**PRIETO, Judith; et al.** “Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua”. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* [en línea], 2009, (México) 10 (1), p. 5. [Consulta: 03 junio 2021]. ISSN 1870-0462 .Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/939/93911243003.pdf>

**PROGRAMA CONJUNTO DE LA FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS.** *Orientaciones para una evaluación sencilla de la ingesta de aditivos alimentarios* [en línea]. Roma, Italia, 2012 [Consulta: 03 de agosto de 2020]. Disponible en: [http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFA/CCFA44/fa44\\_02s.pdf](http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFA/CCFA44/fa44_02s.pdf)

**REPETTO, Manuel & REPETTO, Guillermo.** *Toxicología fundamental*. 4ª ed. Sevilla-España: Ediciones Díaz de Santos, 2009. ISBN 978-84-7978-898-8, pp. 69-71.

**REYES, Yuliet; et al.** "Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria". *Ingeniería Investigación y Desarrollo* [en línea], 2016, (16)2, pp. 66-77. [Consulta: 14 de julio de 2020]. ISSN 2422-4324. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6096110>.

**ROCA, Ana.** *Contaminación de suelos por metales pesados* [en línea]. Infoagro, 2016. [Consulta: 10 de julio 2020]. Disponible en: [https://www.infoagro.com/abonos/contaminacion\\_suelos\\_metales\\_pesados.html](https://www.infoagro.com/abonos/contaminacion_suelos_metales_pesados.html)

**RODRÍGUEZ, Natalia; et al.** *La contaminación del suelo: una realidad oculta* [en línea]. Roma-Italia: FAO, 2019. [Consulta: 24 de mayo de 2020]. ISBN 9789251316399. Disponible en: <http://www.fao.org/3/I9183ES/i9183es.pdf>

**ROMERO, Cinthia.** Determinación de cadmio y plomo por espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito en pastos del cantón Quero afectados por las cenizas del volcán Tungurahua [en línea] (Trabajo de titulación). Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias e ingeniería en alimentos, Escuela de Ingeniería Bioquímica. Ambato, Ecuador, 2017. pp. 1-66 [Consulta: 24 de mayo 2020]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/25810/1/BQ%20126.pdf>

**RUBIO, Ana.** La densidad aparente en suelos forestales del parque natural los alcornocales [en línea] (trabajo de titulación). Universidad de Sevilla, Sevilla, España. 2019. pp: 22-23. [Consulta: 12 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/57951/1/La%20densidad%20aparente%20en%20suelos%20forestales%20.pdf>

**SAMANIEGO, Pablo; et al.** “Petrological analysis of the pre-eruptive magmatic process prior to the 2006 explosive eruptions at Tungurahua volcano (Ecuador)”. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* [en línea], 2011, (Francia) 199 (1-2), pp. 69-84. [Consulta: 29 mayo 2021]. ISSN 03770273. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2010.10.010>

**SÁNCHEZ, Esteban; et al.** “Mineralogical and multi-elemental analysis of the volcanic ash, product of the Cotopaxi eruption on 2015 by x-ray diffraction (XRD) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and its possible applications and impacts”. *InfoAnalítica 6* [en línea], 2018, (Ecuador) 18 (2), pp.9-23. [Consulta: 29 mayo 2021]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/330716048\\_ANALISIS\\_MINERALOGICO\\_Y\\_MULTIELEMENTAL\\_DE\\_LA\\_CENIZA\\_VOLCANICA\\_PRODUCTO\\_DE\\_LA\\_ERUPCION\\_DEL\\_COTOPAXI\\_EN\\_2015\\_POR\\_DIFRACCION\\_DE\\_RAYOS\\_X\\_XRD\\_Y\\_ESPECTROMETRIA\\_DE\\_MASAS\\_CON\\_PLASMA\\_ACOPLADO\\_INDUCTIVAMENTE\\_IC](https://www.researchgate.net/publication/330716048_ANALISIS_MINERALOGICO_Y_MULTIELEMENTAL_DE_LA_CENIZA_VOLCANICA_PRODUCTO_DE_LA_ERUPCION_DEL_COTOPAXI_EN_2015_POR_DIFRACCION_DE_RAYOS_X_XRD_Y_ESPECTROMETRIA_DE_MASAS_CON_PLASMA_ACOPLADO_INDUCTIVAMENTE_IC)

**SÁNCHEZ, Esteban.** Análisis mineralógico y multielemental de la ceniza volcánica, colectada en una hacienda en el sector de Machachi, por difracción de rayos X (XRD) y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), y sus posibles aplicaciones e impactos [en línea] (Trabajo de titulación). Pontificia Universidad Católica del Ecuador Bulgaria, Quito, Ecuador. 2017.

[Consulta: 02 junio 2021]. Disponible en:  
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13495/Trabajo%20de%20disertaci%C3%B3n%20%20Licenciatura%20%20Esteban%20Patricio%20S%C3%A1nchez%20Carrillo.%20%202020PUCE%20-%20202017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**SERVICIO GEOLÓGICO DE LOS ESTADOS UNIDOS.** *Effects on Pastures*. [blog].2015.  
[Consulta: 02 junio 2021]. Disponible en:  
[https://volcanoes.usgs.gov/volcanic\\_ash/ash\\_composition\\_pastures.html](https://volcanoes.usgs.gov/volcanic_ash/ash_composition_pastures.html)

**SINGH, Balwant; & SCHULZE, Darrell.** “Soil Minerals and Plant Nutrition”. *Nature Education Knowledge* [en línea], 2015, (Australia) 6(1). [Consulta: 02 agosto 2021]. Disponible en:  
<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/soil-minerals-and-plant-nutrition-127881474/>

**TAMIME, A.** *Milk processing and Quality Management* [en línea]. Chicester-Reino Unido: John Wiley and Sons Ltd, 2009. [Consulta: 09 noviembre 2020]. Disponible en:  
[https://www.academia.edu/6279361/Milk\\_Processing\\_and\\_Quality\\_Management](https://www.academia.edu/6279361/Milk_Processing_and_Quality_Management)

**UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.** *IRIS Assessments* [en línea]. EPA, 2016. [Consulta: 14 de julio 2020]. Disponible en: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris\\_drafts/AtoZ.cfm](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/AtoZ.cfm)

**US EPA. 2015.** *Method 120.1: Conductance (Specific Conductance,  $\mu\text{mhos } 25^\circ\text{C}$ ) by Conductivity Meter*

**US EPA. 2015.** *METHOD 9045D SOIL AND WASTE pH.*

**USCANGA, LF; et al.** “Technical position on milk and its derivatives in adult health and disease from the Asociación Mexicana de Gastroenterología and the Asociación Mexicana de Gerontología y Geriatria”. *Revista de Gastroenterología de México* [en línea], 2019, (México) 84(3), pp. 357-371. [Consulta: 23 mayo 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rgmxen.2019.03.002>

**USMAN, Kamal; et al.** " The assessment of cadmium, chromium, copper, and nickel tolerance and bioaccumulation by shrub plant *Tetraena qataranse*". *Scientific Reports*. [En línea], 2019,

(United State of America) 9, pp. 1-11. [Consulta: 25 de junio de 2020]. ISSN 20452322. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6449511/pdf/41598\\_2019\\_Article\\_42029.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6449511/pdf/41598_2019_Article_42029.pdf)

**VILLASEÑOR, Diego.** *Fundamentos y procedimientos para análisis físicos y morfológicos del suelo* [en línea]. Machala-Ecuador: Ediciones UTMACH, 2016. [Consulta: 11 de mayo de 2021]. ISBN 978-9942-24-082-8. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10690/1/FUNDAMENTOS%20Y%20PROCEDIMIENTOS.pdf>

**VYSLOUZILOVÁ, M; et al.** "As, Cd, Pb, and Zn uptake, by *Salix* spp. Clones grown in soils enriched by high loads os these elements". *Revista Agricultura* [en línea], 2003, 5, pp. 191–196. [Consulta: 13 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/52849.pdf>

**WESTLAB.** *Measurement of pH in Plant Tissue*. [blog].2018. [Consulta: 13 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.westlab.com/blog/2018/01/09/measurement-of-ph-in-plant-tissue>

**WINGCHING, Rodolfo; & MORA, Esteban.** “Efecto de agregar agua sobre el punto crioscópico y componentes de la leche cruda de vacas Jersey y Holstein”. *UNED Revista de Investigación* [en línea], 2019, (Costa Rica) 11(3), pp. 313-319. [Consulta: 24 mayo 2021]. ISSN 1659-441X. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/cinn/v11n3/1659-4266-cinn-11-03-00313.pdf>

**ZENG, Fanrong; et al.** “The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants”. *Environmental Pollution* [en línea], 2011, (China) 159 (1), pp. 84-91. [Consulta: 03 junio 2021]. ISSN 02697491. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.019>

**ZHANG, Xiuying; et al.** " Impact of soil heavy metal pollution on food safety in China". *PLoS ONE* [en línea], 2015, (10)8, pp. 1-14. [Consulta: 14 de julio de 2020]. ISSN 19326203. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4529268/pdf/pone.0135182.pdf>.

## ANEXOS

### ANEXO A: ENCUESTA DE PLAN DE MUESTREO DE LA PARROQUIA BILBAO



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El objetivo de esta encuesta es obtener información sobre las actividades agropecuarias a las que se dedican los habitantes de la parroquia Bilbao con la finalidad de establecer un plan de muestreo sobre las zonas con mayor afectación ante la caída de ceniza del volcán Tungurahua y que han provocado contaminación de suelo, forraje y leche por metales pesados.

#### ENCUESTA

**NOMBRE:** \_\_\_\_\_

**EDAD:** \_\_\_\_\_

**HABITANTES POR HOGAR:** \_\_\_\_\_

**TELÉFONO/CELULAR:** \_\_\_\_\_

Señale con una **X** su respuesta

**1. Indique en qué comunidad de la parroquia Bilbao vive usted.**

- Centro Parroquial \_\_\_\_\_
- Motilones \_\_\_\_\_
- Yuibug \_\_\_\_\_
- Chontapamba \_\_\_\_\_

**2. ¿Qué tipo de actividad agropecuaria realiza?**

- Actividad agrícola \_\_\_\_\_
- Actividad ganadera \_\_\_\_\_
- Actividad agrícola y ganadera \_\_\_\_\_

**3. ¿Qué productos agrícolas cultiva usted?**

- Maíz \_\_\_\_\_
- Pasto \_\_\_\_\_
- Tomate de árbol \_\_\_\_\_
- Fréjol \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

**4. ¿Cuál es la extensión del terreno cultivable que usted posee?**

- Menor a 5 cuadras \_\_\_\_\_
- 5 a 10 cuadras \_\_\_\_\_
- 11 a 15 cuadras \_\_\_\_\_
- 16 a 20 cuadras \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

**5. ¿Qué tipo de plaguicida utiliza?**

- Sello rojo \_\_\_\_\_
- Sello amarillo \_\_\_\_\_
- Sello azul \_\_\_\_\_
- Sello verde \_\_\_\_\_

**6. ¿Cuál es el nombre de los plaguicidas que usted utiliza con más frecuencia en sus cultivos y por qué?**

a. Nombre: .....

b. ¿Por qué?.....

**7. ¿Cada qué tiempo realiza la fumigación con plaguicidas y fungicidas en sus terrenos?**

- Cada mes \_\_\_\_\_
- Cada 3 meses \_\_\_\_\_
- Cada 6 meses \_\_\_\_\_

**8. ¿Cuántas cabezas de ganado posee?**

\_\_\_\_\_

**9. ¿Cuál es la raza de su ganado?**

- Holstein-Friesian \_\_\_\_\_
- Brown Swiss \_\_\_\_\_
- Guernsey \_\_\_\_\_
- Jersey \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

**10. ¿Qué tipo de actividad agrícola realiza para la alimentación de su ganado vacuno?**

- Cultivo de pasto \_\_\_\_\_
- Cultivo de maíz \_\_\_\_\_
- Cultivo de alfalfa \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

**11. ¿Cuántos litros de leche al día produce su ganado?**

- 5-10

- 11-20 L
- 21-40 L
- Más de 40 L

12. **La leche que su ganado produce tiene alguna línea de distribución**

- Si \_\_\_\_\_
- No \_\_\_\_\_

13. **¿Cuáles son las líneas de distribución de la leche que produce?**

- Venta a centros de acopio \_\_\_\_\_
- Producción de quesos, yogurt, mantequilla \_\_\_\_\_
- Solo para el consumo familiar \_\_\_\_\_

14. **¿Con qué frecuencia consume la leche producida en el sector?**

- 1-2 veces al día \_\_\_\_\_
- 2-3 veces al día \_\_\_\_\_
- Más de 3 veces al día \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

15. **¿Qué tipo de actividades pecuarias realiza en su comunidad?**

- Crianza de ganado porcino \_\_\_\_\_
- Crianza de ganado vacuno \_\_\_\_\_
- Crianza de cuyes y conejos \_\_\_\_\_
- Crianza de aves de corral \_\_\_\_\_
- Otros, ¿cuáles? \_\_\_\_\_

**Nota:** El Grupo Asociado de Investigación en Biotecnología Ambiente y Química - GAIBAQ de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, agradece su colaboración ante la información proporcionada en esta encuesta, la misma que tiene fines investigativos que beneficiarán a la Parroquia Bilbao. A la vez

Yo \_\_\_\_\_ declaro que he sido **informado** e invitado a participar de la investigación denominada “DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN EL FORRAJE CONSUMIDO POR EL GANADO VACUNO DE LA PARROQUIA BILBAO Y EVALUACIÓN DE SU INCIDENCIA EN LA CADENA ALIMENTARIA.”, este es un proyecto de investigación científica, sin fines de lucro, que cuenta con el respaldo \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ la \_\_\_\_\_ Junta \_\_\_\_\_ Parroquial \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ Bilbao.

## ANEXO B: LEVANTAMIENTO DE LA INFORMACIÓN MEDIANTE ENCUESTAS



**Figura 1:** Socialización del estudio a los pobladores de la parroquia Bilbao



**Figura 2:** Realización de encuestas

## ANEXO C: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO, FORRAJE Y LECHE



**Figura 3:** Identificación del área de muestreo.



**Figura 4:** Delimitación del área de muestreo en zig zag con estacas y piola.



**Figura 5:** Toma de muestra de suelo.



**Figura 6:** Recolección de muestras de suelo por duplicado.



**Figura 7:** Toma de muestra de forraje



**Figura 8:** Determinación de temperatura y humedad con un termo higrómetro



**Figura 9:** Toma de muestras de leche



**Figura 10:** Toma de muestras de leche

#### ANEXO D: PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SUELO Y FORRAJE EN EL LABORATORIO



**Figura 11:** Secado de muestras de suelo a temperatura ambiente.



**Figura 12:** Muestra de suelo tamizada



**Figura 13:** Muestra de suelo almacenadas en fundas ziploc codificadas.



**Figura 14:** Limpieza de muestras de forraje



**Figura 15:** Secado a 105 °C del forraje molido para la realización de los diferentes análisis.



**Figura 16:** Muestras molidas de forraje almacenadas en fundas ziploc codificadas.



**Figura 17:** Muestras de forraje en envases estériles almacenadas en un desecador para evitar que adquieran humedad.

## ANEXO E: ANÁLISIS DE SUELO



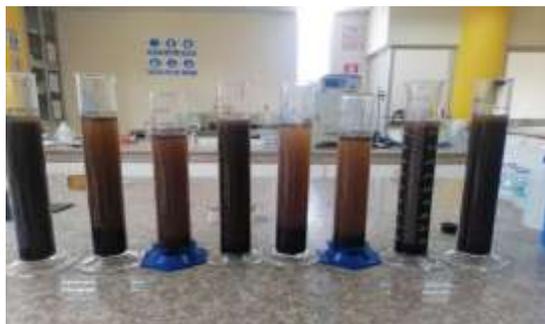
**Figura 18:** Preparación de la solución para medición de pH y CE en muestras de suelo.



**Figura 19 :** Medición de conductividad eléctrica



**Figura 20:** Determinación de densidad real en suelo.



**Figura 21:** Determinación de densidad aparente en suelo.



**Figura 22:** Determinación de textura en suelo.



**Figura 23:** Pesado de crisoles para materia orgánica



**Figura 24:** Pesado de muestras para la determinación de Carbono y Nitrógeno



**Figura 25:** Digestión de suelo con  $H_2SO_4$  para determinación de K y P.



<p><b>Figura 26:</b> Determinación de potasio en el fotómetro de llama.</p>	<p><b>Figura 27:</b> Determinación de fósforo en el espectrofotómetro UV-VIS</p>
	
<p><b>Figura 28:</b> Digestión de muestras de suelo con HNO<sub>3</sub></p>	<p><b>Figura 29:</b> Determinación de Pb, Cd, As, Hg y Se en el espectrofotómetro de absorción atómica.</p>

**ANEXO F: ANÁLISIS DE FORRAJE**

	
<p><b>Figura 30:</b> Agitación de muestras de forraje para medición de pH y CE</p>	<p><b>Figura 31:</b> Centrifugación de extractos de forraje para determinar CE</p>



**Figura 32:** Filtración de extractos de forraje para determinar CE.



**Figura 33:** Medición de pH y CE



**Figura 34:** Preparación de extractos de forraje para la medición de aniones.



**Figura 35:** Mezcla de la muestra y reactivo HACH para la medición de fosfatos, nitratos, sulfatos



**Figura 36:** Formación de un color azul ante la presencia de fosfatos en la muestra de forraje.



**Figura 37:** Formación de turbiedad en las muestras de forraje ante la presencia de sulfatos.



**Figura 38:** Formación de un color ámbar en las muestras de forraje ante la presencia de nitratos.



**Figura 39:** Medición de aniones en el espectrofotómetro HACH



**Figura 40:** Muestras de forraje con  $K_2CrO_4$  para determinación de cloruros.



**Figura 41:** Muestras de forraje valoradas con  $AgNO_3$  para determinación de cloruros.



**Figura 42:** Digestión de forraje con  $H_2SO_4$  para determinación de Na, K y P.



**Figura 43:** Muestras de forraje digeridas.



**Figura 44:** Medición de Na y K en el Fotómetro de llama.



**Figura 45:** Determinación de fósforo en el espectrofotómetro UV-VIS



**Figura 46:** Determinación de Carbono y Nitrógeno.



**Figura 47:** Digestión de muestras de forraje con  $\text{HNO}_3$



**Figura 48:** Muestras de forraje digeridas y aforadas a 50mL.



**Figura 49:** Determinación de Pb, Cd, As, Hg y Se en el espectrofotómetro de absorción atómica.

## ANEXO G: ANÁLISIS DE LECHE



**Figura 50:** Análisis de leche en el equipo Lactoscan.



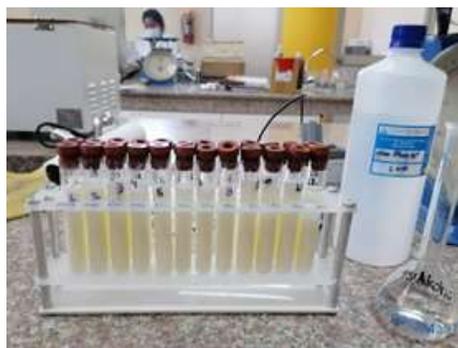
**Figura 51:** Determinación de acidez titulable.



**Figura 52:** Cenizas de muestras de leche



**Figura 53:** Ensayo de reductasa.



**Figura 54:** Análisis de estabilidad proteica.



**Figura 55:** Adición de cloruro férrico para la identificación de formaldehído.



**Figura 56:** Resultado negativo en la identificación de peróxido de hidrógeno.



**Figura 57:** Adición de ácido acético para la identificación de cloro, hipocloritos y cloraminas en leche.



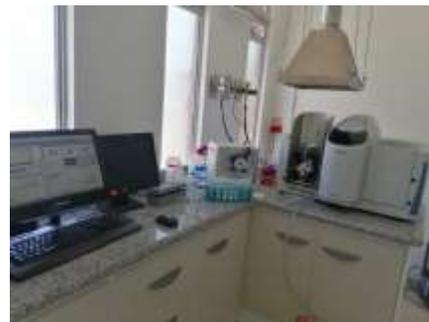
**Figura 58:** Adición de alizarol para identificación de neutralizantes.



**Figura 59:** Adición de lugol para la detección de almidón.



**Figura 60:** Digestión finalizada de muestras de leche para determinación de Pb, Cd, As, Hg y Se.



**Figura 61:** Determinación de Pb, Cd, As, Hg y Se en el espectrofotómetro de absorción atómica.

# ANEXO H: CERTIFICADOS DE CALIDAD DE LOS ESTÁNDARES DE METALES PESADOS.

## Certificado de Plomo



# Certificate





This certificate is designed in accordance with ISO Guide 31<sup>(1)</sup>

**Object of certification: Lead Standard for AAS**

Product No.: 16585  
 Lot: BCC02568  
 Composition: Lead nitrate (pure material) in 2% HNO<sub>3</sub> (prepared with HNO<sub>3</sub>, suitable for trace analysis and high-purity water, 18.2 M $\Omega$ cm, 0.22  $\mu$ m filtered)  
 Density at 20°C:  $\rho = 1010.7 \text{ kg m}^{-3}$      $\rho_{\text{Li}} = 0.5 \text{ kg m}^{-3}$   
 Intended use: Calibration of AAS, ICP, spectrophotometry or any other analytical technique.  
 Storing and handling: This reference material shall be stored between 5°C and 30°C. Before every use of the material the bottle must be shaken well and its temperature has to be 20°C. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should be tightly sealed and the bottle should be stored at reduced temperature (e.g. refrigerator) to minimize transpiration rate.  
 Expiry date: APR 2023  
 Certificate issue date: 19 MAY 2020  
 Certification version: 01  
 Bottle opening date: .....

Certified value traceable to SI unit kg and uncertainty according to ISO Guide 35 <sup>(2)</sup> and Eurachem/CITAC Guide <sup>(3)</sup>		
Constituent	Certified value at 20°C and expanded uncertainty (J = #s, A = 2)	
<b>Lead</b>	<b>990 mg kg<sup>-1</sup> ± 4 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>1'000 mg L<sup>-1</sup> ± 4 mg L<sup>-1</sup></b>

**1. CONCEPT OF CERTIFICATION AND TRACEABILITY STATEMENT**

To guarantee top reliability of the values for this TraceCERT<sup>®</sup> certified reference material three independent procedures were followed. The values have to agree in the range of their uncertainties, but the impurity conceded value from the gravimetric preparation has been chosen as certified value<sup>(4)</sup>.

- Gravimetric preparation using pure materials is a practical realization of concentration units, through conversion of masses and mole fraction to mass fraction<sup>(5)</sup>. If the purity of the materials is demonstrated and if contamination and loss of material is strictly prevented this approach allows highest accuracy and small uncertainties. The certified value of TraceCERT<sup>®</sup> reference materials is based on this approach and directly traceable to the SI unit kilogram.
- Therefore comprehensively characterized materials of highest purity are used (see paragraph 2). All balances are certified by DKD and calibrated with SI-traceable weights. F2 (up to 12 kg) and F2 (up to 64 kg) weights. The bulk solution was homogenized by overhead tumbling in a PVCF container for at least 6 hours. A peristaltic pump with perfluorinated polymer fittings was used for bottling.
- The starting material is measured against a certified reference material (e.g. NIST or BAM) followed by gravimetric preparation using balances calibrated with SI-traceable weights. Consequently the value calculated by the unbroken chain of comparisons is traceable to the reference to which the starting material is compared.
- Whenever applicable the bottled TraceCERT<sup>®</sup> calibration solution is compared to a second reference which is independent from the first reference.

Certificate page 1 of 2

Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestraße 25, 9411 Buchhof/Breitbrunn, Tel: +49-49-753-0711, Fax: +49-49-753-0490



### 2. PURITY OF STARTING MATERIALS

For high purity materials (P > 99.9%) the most appropriate way of purity determination is to quantify the impurities ( $v_i$ ) and to subtract the sum from 100%. Impurities below the detection limit are considered with a contribution of half of the detection limit ( $DL_i$ ).

$$P = 100\% - \sum_i v_i - \sum_i \left( \frac{DL_i}{2} \right)$$

Water containing materials were dried to absolute dryness by individual drying conditions (up to 600°C). When drying is impossible due to decomposition water was determined by high-precision KF-titration at Sigma-Aldrich. High purity water (18.2 M $\Omega$ cm; 0.22  $\mu$ m filtered, all metallic traces at ng kg<sup>-1</sup>-level) and high purity acid for trace analysis were used for preparation.

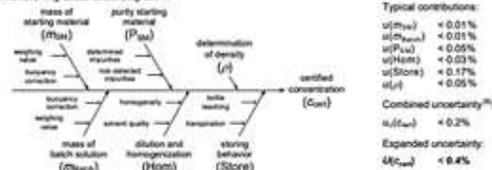
### 3. TRACEABILITY MEASUREMENTS

Only internationally accepted reference materials e.g. from NIST (USA) or BAM (Germany) have been carefully selected to provide the basis for traceability to the SI unit mole. When no such reference is available, an elemental metal or an adequate salt of highest available purity is used to confirm traceability to this pure material (and therefore to the SI unit kg). To underpin the certified gravimetric value all traceability measurements are performed with the most accurate and precise analytical technique available. Therefore primary measurement series are applied whenever possible (corrected for trace impurities). When no primary technique is available, the traceability measurements are performed with another analytical technique, e.g. XCP-OES or AAS.

Reference and applied technique used for traceability measurements of the starting material: NIST SRM 726 / complexometric titration  
 bottled solution: BAM 365 / complexometric titration

### 4. UNCERTAINTY EVALUATION

All uncertainties are calculated according to Eurachem/CITAC Guide<sup>(3)</sup> and reported as combined expanded uncertainties at the 95% confidence level. For gravimetric preparation the uncertainty contributions are illustrated by the following cause-effect diagram<sup>(6)</sup>.



CRM operations: 

Approving Officer: 

P. Zet, Ph.D.





(1) ISO Guide 31:2013, "Reference materials - Contents of certificates, labels and accompanying documentation"  
 (2) ISO Guide 35:2017, "Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability"  
 (3) Eurachem/CITAC Guide, 1<sup>st</sup> Ed. (2000), "Quantifying uncertainty in analytical measurement"  
 (4) Eurachem/CITAC Guide, 1<sup>st</sup> Ed. (2000), "Traceability in chemical measurement"  
 (5) Knecht, A., Staudt, S., Dittler, M., Berger, H. (2004), "The priority of weighing data obtained with electronic analytical balances", Metrologia & AIA 14E: 123-141  
 (6) Calculated by combination of the expanded contribution values  
 Certificate page 2 of 2

# Certificado de Cadmio



TraceCERT®  
Traceable Certified Reference Materials

## Certificate





This certificate is designed in accordance with ISO Guide 31<sup>(1)</sup>.

**Object of certification:** Cadmium Standard for AAS  
**Product No.:** 51994  
**Lot:** BCCD0987  
**Composition:** Cadmium metal (pure material) in 2% HNO<sub>3</sub> (prepared with HNO<sub>3</sub>, suitable for trace analysis and high-purity water, 18.2 MΩcm, 0.22 μm filtered).  
 $\rho = 1010.7 \text{ kg m}^{-3}$   $\alpha_{\text{Cd}}(\rho) = 0.5 \text{ kg m}^{-3}$   
**Intended use:** Calibration of AAS, ICP, spectrophotometry or any other analytical technique.  
**Storing and handling:** This reference material shall be stored between 5°C and 30°C. Before every use of the material the bottle must be shaken well and its temperature has to be 20°C. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should be tightly sealed and the bottle should be stored at reduced temperature (e.g. refrigerator) to minimize transpiration rate.  
**Expiry date:** MAR 2023  
**Certificate issue date:** 17 JUN 2020  
**Certification version:** 01  
**Bottle opening date:** \_\_\_\_\_

Constituent	Certified value at 20°C and expanded uncertainty (U = k · u, k = 2)	Certified value traceable to SI unit kg and uncertainty according to ISO Guide 35 <sup>(2)</sup> and Eurachem/CITAC Guide <sup>(3)</sup>
<b>Cadmium</b>	<b>989 mg kg<sup>-1</sup> ± 4 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>1000 mg L<sup>-1</sup> ± 4 mg L<sup>-1</sup></b>

**1. CONCEPT OF CERTIFICATION AND TRACEABILITY STATEMENT**  
 To guarantee top reliability of the values for this TraceCERT<sup>®</sup> certified reference material three independent procedures were followed. The values have to agree in the range of their uncertainties, but the impurity content value from the gravimetric preparation has been chosen as certified value<sup>(4)</sup>.  
 1. Gravimetric preparation using pure materials is a practical realization of concentration units, through conversion of masses and mole fraction to mass fraction<sup>(5)</sup>. If the purity of the materials is demonstrated and if contamination and loss of material is strictly prevented this approach allows highest accuracy and small uncertainties. The certified value of TraceCERT<sup>®</sup> reference materials is based on this approach and directly traceable to the SI unit kilogram.  
 Therefore comprehensively characterized materials of highest purity are used (see paragraph 2). All balances are certified by DKD and calibrated with OIML Class E2 (up to 12 kg) and F2 (up to 64 kg) weights. The bulk solution was homogenized by overhead tumbling in a PVDF container for at least 6 hours. A peristaltic pump with perfluorinated polymer fittings was used for bottling.  
 2. The starting material is measured against a certified reference material (e.g. NIST or BAM) followed by gravimetric preparation using balances calibrated with SI-traceable weights. Consequently the value calculated by this unbroken chain of comparisons is traceable to the reference to which the starting material is compared.  
 3. Whenever applicable the bottled TraceCERT<sup>®</sup> calibration solution is compared to a second reference which is independent from the first reference.

Sigma-Aldrich Product Group, Industriestrasse 29, 64711 Buchen/Berlinried, Tel. +49 (0) 63 02 31 11, Fax +49 (0) 63 02 34 80 **SIGMA-ALDRICH**

**2. PURITY OF STARTING MATERIALS**  
 For high purity materials (P > 99.9%) the most appropriate way of purity determination is to quantify the impurities (i, ...) and to subtract the sum from 100%. Impurities below the detection limit are considered with a contribution of half of the detection limit (DL).  

$$P = 100\% - \sum_{i=1}^n x_i - \sum_{j=1}^m \left( \frac{DL_j}{2} \right)$$
  
 Water containing materials were dried to absolute dryness by individual drying conditions (up to 600°C). When drying is impossible due to decomposition water was determined by high-precision KF-titration at Sigma-Aldrich. High purity water (18.2 MΩcm, 0.22 μm filtered, all metallic traces at ng kg<sup>-1</sup>-level) and high purity acid for trace analysis were used for preparation.

**3. TRACEABILITY MEASUREMENTS**  
 Only internationally accepted reference materials e.g. from NIST (USA) or BAM (Germany) have been carefully selected to provide the basis for traceability to the SI unit mole. When no such reference is available, an elemental metal or an adequate salt of highest available purity is used to confirm traceability to this pure material (and therefore to the SI unit kg).  
 To underpin the certified gravimetric value all traceability measurements are performed with the most accurate and precise analytical technique available. Therefore primary measurement series are applied whenever possible (corrected for trace impurities). When no primary technique is available, the traceability measurements are performed with another analytical technique, e.g. ICP-OES or AAS.  
 Reference and applied technique used for traceability measurements of the starting material: NIST SRM 728 / complexometric titration  
 bottled solution: BAM 365 / complexometric titration

**4. UNCERTAINTY EVALUATION**  
 All uncertainties are calculated according to Eurachem/CITAC Guide<sup>(6)</sup> and reported as combined expanded uncertainties at the 95% confidence level. For gravimetric preparation the uncertainty contributions are illustrated by the following cause-effect diagram<sup>(7)</sup>.

mass of starting material (m<sub>start</sub>)

weighing error

balance uncertainty

homogenization

mass of batch solution (m<sub>batch</sub>)

purify starting material (P<sub>start</sub>)

determined impurities

not detected impurities

homogenization

dilution and homogenization (H<sub>hom</sub>)

determination of density (ρ)

balance uncertainty

transpiration

storing behaviour (Store)

certified concentration (C<sub>cert</sub>)

Typical contributions:  
 u(m<sub>start</sub>) < 0.01%  
 u(P<sub>start</sub>) < 0.01%  
 u(P<sub>start</sub>) < 0.05%  
 u(H<sub>hom</sub>) < 0.03%  
 u(Store) < 0.17%  
 u(ρ) < 0.05%  
 Combined uncertainty<sup>(8)</sup>:  
 u(C<sub>cert</sub>) < 0.2%  
 Expanded uncertainty:  
 U(C<sub>cert</sub>) < 0.4%

CRM operations: *S. Meier*  
 Approving Officer: *[Signature]*  
 P. Zed, Ph.D.





(1) ISO Guide 31:2015, Reference materials - Contents of certificates, labels and accompanying documentation.  
 (2) ISO Guide 35:2017, Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.  
 (3) Eurachem/CITAC Guide, 1<sup>st</sup> Ed. (2002) "Traceability in chemical measurement".  
 (4) International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC (2004), "The uncertainty of weighing data obtained with electronic analytical balances".  
 (5) Calculated by summation of the squared contribution values.  
 Sigma-Aldrich Product Group, Industriestrasse 29, 64711 Buchen/Berlinried, Tel. +49 (0) 63 02 31 11, Fax +49 (0) 63 02 34 80 **SIGMA-ALDRICH**

# Certificado de Mercurio



TraceCERT®  
Traceable Certified Reference Materials

## Certificate





This certificate is designed in accordance with ISO Guide 31<sup>(1)</sup>.

**Object of certification:** Mercury Standard for AAS  
**Product No.:** 16482  
**Lot:** BCCB0630  
**Composition:** Mercury metal (pure material) in 12% HNO<sub>3</sub> (prepared with HNO<sub>3</sub>, suitable for trace analysis and high-purity water, 18.2 MΩcm, 0.22 μm filtered).  
 $\rho = 1067.5 \text{ kg m}^{-3}$   $\alpha_{\text{Hg}}(\rho) = 0.5 \text{ kg m}^{-3}$   
**Intended use:** Calibration of AAS, ICP, spectrophotometry or any other analytical technique.  
**Storing and handling:** This reference material shall be stored between 5°C and 30°C. Before every use of the material the bottle must be shaken well and its temperature has to be 20°C. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should be tightly sealed and the bottle should be stored at reduced temperature (e.g. refrigerator) to minimize transpiration rate.  
**Expiry date:** JUL 2022  
**Certificate issue date:** 16 AUG 2019  
**Certification version:** 01  
**Bottle opening date:** \_\_\_\_\_

Constituent	Certified value at 20°C and expanded uncertainty (U = k · u, k = 2)	Certified value traceable to SI unit kg and uncertainty according to ISO Guide 35 <sup>(2)</sup> and Eurachem/CITAC Guide <sup>(3)</sup>
<b>Mercury</b>	<b>937 mg kg<sup>-1</sup> ± 4 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>1'000 mg L<sup>-1</sup> ± 4 mg L<sup>-1</sup></b>

**1. CONCEPT OF CERTIFICATION AND TRACEABILITY STATEMENT**  
 To guarantee top reliability of the values for this TraceCERT<sup>®</sup> certified reference material three independent procedures were followed. The values have to agree in the range of their uncertainties, but the impurity content value from the gravimetric preparation has been chosen as certified value<sup>(4)</sup>.  
 1. Gravimetric preparation using pure materials is a practical realization of concentration units, through conversion of masses and mole fraction to mass fraction<sup>(5)</sup>. If the purity of the materials is demonstrated and if contamination and loss of material is strictly prevented this approach allows highest accuracy and small uncertainties. The certified value of TraceCERT<sup>®</sup> reference materials is based on this approach and directly traceable to the SI unit kilogram.  
 Therefore comprehensively characterized materials of highest purity are used (see paragraph 2). All balances are certified by DKD and calibrated with OIML Class E2 (up to 12 kg) and F2 (up to 64 kg) weights. The bulk solution was homogenized by overhead tumbling in a PVDF container for at least 6 hours. A peristaltic pump with perfluorinated polymer fittings was used for bottling.  
 2. The starting material is measured against a certified reference material (e.g. NIST or BAM) followed by gravimetric preparation using balances calibrated with SI-traceable weights. Consequently the value calculated by this unbroken chain of comparisons is traceable to the reference to which the starting material is compared.  
 3. Whenever applicable the bottled TraceCERT<sup>®</sup> calibration solution is compared to a second reference which is independent from the first reference.

Sigma-Aldrich Product Group, Industriestrasse 29, 64711 Buchen/Berlinried, Tel. +49 (0) 63 02 31 11, Fax +49 (0) 63 02 34 80 **SIGMA-ALDRICH**

**2. PURITY OF STARTING MATERIALS**  
 For high purity materials (P > 99.9%) the most appropriate way of purity determination is to quantify the impurities (i, ...) and to subtract the sum from 100%. Impurities below the detection limit are considered with a contribution of half of the detection limit (DL).  

$$P = 100\% - \sum_{i=1}^n x_i - \sum_{j=1}^m \left( \frac{DL_j}{2} \right)$$
  
 Water containing materials were dried to absolute dryness by individual drying conditions (up to 600°C). When drying is impossible due to decomposition water was determined by high-precision KF-titration at Sigma-Aldrich. High purity water (18.2 MΩcm, 0.22 μm filtered, all metallic traces at ng kg<sup>-1</sup>-level) and high purity acid for trace analysis were used for preparation.

**3. TRACEABILITY MEASUREMENTS**  
 Only internationally accepted reference materials e.g. from NIST (USA) or BAM (Germany) have been carefully selected to provide the basis for traceability to the SI unit mole. When no such reference is available, an elemental metal or an adequate salt of highest available purity is used to confirm traceability to this pure material (and therefore to the SI unit kg).  
 To underpin the certified gravimetric value all traceability measurements are performed with the most accurate and precise analytical technique available. Therefore primary measurement series are applied whenever possible (corrected for trace impurities). When no primary technique is available, the traceability measurements are performed with another analytical technique, e.g. ICP-OES or AAS.  
 Reference and applied technique used for traceability measurements of the starting material: NIST SRM 728 / complexometric titration  
 bottled solution: BAM 365 / complexometric titration

**4. UNCERTAINTY EVALUATION**  
 All uncertainties are calculated according to Eurachem/CITAC Guide<sup>(6)</sup> and reported as combined expanded uncertainties at the 95% confidence level. For gravimetric preparation the uncertainty contributions are illustrated by the following cause-effect diagram<sup>(7)</sup>.

mass of starting material (m<sub>start</sub>)

weighing error

balance uncertainty

homogenization

mass of batch solution (m<sub>batch</sub>)

purify starting material (P<sub>start</sub>)

determined impurities

not detected impurities

homogenization

dilution and homogenization (H<sub>hom</sub>)

determination of density (ρ)

balance uncertainty

transpiration

storing behaviour (Store)

certified concentration (C<sub>cert</sub>)

Typical contributions:  
 u(m<sub>start</sub>) < 0.01%  
 u(P<sub>start</sub>) < 0.01%  
 u(P<sub>start</sub>) < 0.05%  
 u(H<sub>hom</sub>) < 0.03%  
 u(Store) < 0.17%  
 u(ρ) < 0.05%  
 Combined uncertainty<sup>(8)</sup>:  
 u(C<sub>cert</sub>) < 0.2%  
 Expanded uncertainty:  
 U(C<sub>cert</sub>) < 0.4%

CRM operations: *S. Meier*  
 Approving Officer: *[Signature]*  
 P. Zed, Ph.D.





(1) ISO Guide 31:2015, Reference materials - Contents of certificates, labels and accompanying documentation.  
 (2) ISO Guide 35:2017, Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.  
 (3) Eurachem/CITAC Guide, 1<sup>st</sup> Ed. (2002) "Traceability in chemical measurement".  
 (4) International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC (2004), "The uncertainty of weighing data obtained with electronic analytical balances".  
 (5) Calculated by summation of the squared contribution values.  
 Sigma-Aldrich Product Group, Industriestrasse 29, 64711 Buchen/Berlinried, Tel. +49 (0) 63 02 31 11, Fax +49 (0) 63 02 34 80 **SIGMA-ALDRICH**

# Certificado de Arsénico



Traceable Certified Reference Materials

## Certificate





This certificate is designed in accordance with ISO Guide 31<sup>1)</sup>

---

**Object of certification:** Arsenic Standard for AAS

**Product No.:** 800388

**Lot:** 800388

**Composition:** Arsenic, trioxide (pure material) in 2% HNO<sub>3</sub> (prepared with HNO<sub>3</sub> and high-purity water for trace analysis and high-purity water, 18.2 MΩcm, 0.22 µm filtered)

**Density at 20°C:** ρ = 1010.5 kg m<sup>-3</sup>    ρ<sub>20</sub>(ρ) = 9.9 kg m<sup>-3</sup>

**Intended use:** Calibration of AAS, ICP, spectrophotometry or any other analytical technique

**Storage and handling:** This reference material shall be stored between 5°C and 20°C. Before every use of the material the bottle must be shaken well and its temperature has to be 20°C. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should be tightly sealed and the bottle should be stored at reduced temperature (e.g. refrigerator) to minimize transportation rate.

**Expiry date:** NOV 2022

**Certificate issue date:** 11 JAN 2019

**Certification version:** 01

**Bottle opening date:** .....

**2. PURITY OF STARTING MATERIALS**

For high purity materials (P > 99.9%) the most appropriate way of purity determination is to quantify the impurities (x<sub>i</sub>) and to subtract the sum from 100%. Impurities below the detection limit are considered with a contribution of half of the detection limit (DL):

$$P = 100\% - \sum_{i=1}^n x_i - \sum_{j=1}^m \left(\frac{DL_j}{2}\right)$$

Water containing materials were dried to absolute dryness by individual drying conditions (up to 600°C). When drying is impossible due to decomposition under size obtained by high-pressure H<sub>2</sub>O vapour at Sigma-Aldrich, high-purity water (18.2 MΩcm, 0.22 µm filtered, all metallic traces at ng kg<sup>-1</sup>-level) and high-purity acid for trace analysis were used for preparation.

**3. TRACEABILITY MEASUREMENTS**

Only internationally accepted reference materials e.g. from NIST (USA) or BAM (Germany) have been carefully selected to provide the basis for traceability to the SI unit mole. When no such reference is available, an elemental metal or an adequate salt of highest available purity is used to confirm traceability to the pure material (and therefore to the SI unit kg).

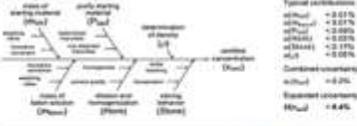
To underpin the certified gravimetric value all traceability measurements are performed with the most accurate and precise analytical technique available. Therefore titrimetric measurement series are applied whenever possible (corrected for trace impurities). When no titrimetric technique is available, the traceability measurements are performed with another analytical technique, e.g. ICP-OES or AAS.

Reference and applied technique used for traceability measurements of the starting material: NIST SRM 3149 / ICP-OES

bottled solution: NIST SRM 3149 / ICP-OES

**4. UNCERTAINTY EVALUATION**

All uncertainties are calculated according to Eurachem/CITAC Guide<sup>2)</sup> and reported as combined expanded uncertainties at the 95% confidence level. For gravimetric preparation the uncertainty contributions are illustrated by the following cause-effect diagram<sup>3)</sup>:



Typical contributions	
w(M <sub>start</sub> )	+0.01%
w(P <sub>start</sub> )	+0.01%
w(ρ <sub>start</sub> )	+0.05%
w(Stor <sub>start</sub> )	+0.03%
w(Stor <sub>end</sub> )	+0.17%
w(D)	+0.02%
<b>Combined uncertainty<sup>4)</sup></b>	<b>+0.2%</b>
<b>Expanded uncertainty<sup>5)</sup></b>	<b>U<sub>95</sub> = +0.4%</b>

**1. CONCEPT OF CERTIFICATION AND TRACEABILITY STATEMENT**

To guarantee the reliability of the values for this TraceCERT<sup>®</sup> certified reference material three independent procedures were followed. The values have to agree in the range of their uncertainties, but the impurity corrected value from the gravimetric preparation has been chosen as certified value<sup>1)</sup>:

- Gravimetric preparation using pure materials is a practical realization of concentration units, through conversion of masses and mole fractions to mass fraction<sup>1)</sup>. If the purity of the materials is demonstrated and if contamination and loss of material is strictly prevented this approach allows highest accuracy and small uncertainties. The certified value of TraceCERT<sup>®</sup> reference materials is based on this approach and directly traceable to the SI unit kilogram.
- Therefore comprehensively characterized materials of highest purity are used (see paragraph 2). All balances are certified by OIML and calibrated with OIML Class E2 (up to 10 kg) and F2 (up to 64 kg) weights. The bulk solution was homogenized by overhead tumbling in a 100% container for at least 8 hours. A peristaltic pump with perfluorinated polymer tubing was used for bottling.
- The starting material is measured against a certified reference material (e.g. NIST or BAM) followed by gravimetric preparation using balances calibrated with SI-traceable weights. Consequently the value calculated by the unbroken chain of comparisons is traceable to the reference to which the starting material is compared.
- Whenever applicable the bottled TraceCERT<sup>®</sup> calibration solution is compared to a second reference which is independent from the first reference.

Certified value traceable to SI unit kg and uncertainty according to ISO Guide 35 <sup>1)</sup> and Eurachem/CITAC Guide <sup>2)</sup>		
Constituent	Certified value at 20°C and expanded uncertainty (U = k · u <sub>c</sub> ; k = 2)	1'000 mg L <sup>-1</sup> ± 4 mg L <sup>-1</sup>
<b>Arsenic</b>	<b>888 mg kg<sup>-1</sup> ± 4 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>888 mg L<sup>-1</sup> ± 4 mg L<sup>-1</sup></b>

CRM operations:  

Approving Officer:  

1) ISO Guide 31:2018, "Reference materials - Concepts of certification, labels and accompanying documentation"  
2) ISO Guide 35:2011, "Reference materials - Guidance for manufacturers and assessment of conformity and legitimacy for use"  
3) Eurachem/CITAC Guide, "8.4.2.2002: 'Uncertainty in chemical measurement'"  
4) Bichmann A., Hübner S., Huber M., Meyer P. S. (2016), "The uncertainty of weighing (and related with electronic analytical balances)", Microchimica Acta 148: 153-163  
5) Calculated by combination of the quoted contribution values

# Certificado de Selenio



Traceable Certified Reference Materials

## Certificate





This certificate is designed in accordance with ISO Guide 31<sup>1)</sup>

---

**Object of certification:** Selenium Standard for AAS

**Product No.:** 800388

**Lot:** 800388

**Composition:** Selenium semi-metal (pure material) in 2% HNO<sub>3</sub> (prepared with HNO<sub>3</sub> and high-purity water, 18.2 MΩcm, 0.22 µm filtered)

**Density at 20°C:** ρ = 1010.5 kg m<sup>-3</sup>    ρ<sub>20</sub>(ρ) = 9.9 kg m<sup>-3</sup>

**Intended use:** Calibration of AAS, ICP, spectrophotometry or any other analytical technique

**Storage and handling:** This reference material shall be stored between 5°C and 20°C. Before every use of the material the bottle must be shaken well and its temperature has to be 20°C. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should be tightly sealed and the bottle should be stored at reduced temperature (e.g. refrigerator) to minimize transportation rate.

**Expiry date:** NOV 2022

**Certificate issue date:** 17 JAN 2020

**Certification version:** 01

**Bottle opening date:** .....

**2. PURITY OF STARTING MATERIALS**

For high purity materials (P > 99.9%) the most appropriate way of purity determination is to quantify the impurities (x<sub>i</sub>) and to subtract the sum from 100%. Impurities below the detection limit are considered with a contribution of half of the detection limit (DL):

$$P = 100\% - \sum_{i=1}^n x_i - \sum_{j=1}^m \left(\frac{DL_j}{2}\right)$$

Water containing materials were dried to absolute dryness by individual drying conditions (up to 600°C). When drying is impossible due to decomposition under size obtained by high-pressure H<sub>2</sub>O vapour at Sigma-Aldrich, high-purity water (18.2 MΩcm, 0.22 µm filtered, all metallic traces at ng kg<sup>-1</sup>-level) and high-purity acid for trace analysis were used for preparation.

**3. TRACEABILITY MEASUREMENTS**

Only internationally accepted reference materials e.g. from NIST (USA) or BAM (Germany) have been carefully selected to provide the basis for traceability to the SI unit mole. When no such reference is available, an elemental metal or an adequate salt of highest available purity is used to confirm traceability to the pure material (and therefore to the SI unit kg).

To underpin the certified gravimetric value all traceability measurements are performed with the most accurate and precise analytical technique available. Therefore titrimetric measurement series are applied whenever possible (corrected for trace impurities). When no titrimetric technique is available, the traceability measurements are performed with another analytical technique, e.g. ICP-OES or AAS.

Reference and applied technique used for traceability measurements of the starting material: NIST SRM 3149 / ICP-OES

bottled solution: NIST SRM 3149 / ICP-OES

**4. UNCERTAINTY EVALUATION**

All uncertainties are calculated according to Eurachem/CITAC Guide<sup>2)</sup> and reported as combined expanded uncertainties at the 95% confidence level. For gravimetric preparation the uncertainty contributions are illustrated by the following cause-effect diagram<sup>3)</sup>:



Typical contributions	
w(M <sub>start</sub> )	+0.01%
w(P <sub>start</sub> )	+0.01%
w(ρ <sub>start</sub> )	+0.05%
w(Stor <sub>start</sub> )	+0.03%
w(Stor <sub>end</sub> )	+0.17%
w(D)	+0.02%
<b>Combined uncertainty<sup>4)</sup></b>	<b>+0.2%</b>
<b>Expanded uncertainty<sup>5)</sup></b>	<b>U<sub>95</sub> = +0.4%</b>

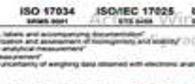
**1. CONCEPT OF CERTIFICATION AND TRACEABILITY STATEMENT**

To guarantee the reliability of the values for this TraceCERT<sup>®</sup> certified reference material three independent procedures were followed. The values have to agree in the range of their uncertainties, but the impurity corrected value from the gravimetric preparation has been chosen as certified value<sup>1)</sup>:

- Gravimetric preparation using pure materials is a practical realization of concentration units, through conversion of masses and mole fractions to mass fraction<sup>1)</sup>. If the purity of the materials is demonstrated and if contamination and loss of material is strictly prevented this approach allows highest accuracy and small uncertainties. The certified value of TraceCERT<sup>®</sup> reference materials is based on this approach and directly traceable to the SI unit kilogram.
- Therefore comprehensively characterized materials of highest purity are used (see paragraph 2). All balances are certified by OIML and calibrated with OIML Class E2 (up to 10 kg) and F2 (up to 64 kg) weights. The bulk solution was homogenized by overhead tumbling in a 100% container for at least 8 hours. A peristaltic pump with perfluorinated polymer tubing was used for bottling.
- The starting material is measured against a certified reference material (e.g. NIST or BAM) followed by gravimetric preparation using balances calibrated with SI-traceable weights. Consequently the value calculated by the unbroken chain of comparisons is traceable to the reference to which the starting material is compared.
- Whenever applicable the bottled TraceCERT<sup>®</sup> calibration solution is compared to a second reference which is independent from the first reference.

Certified value traceable to SI unit kg and uncertainty according to ISO Guide 35 <sup>1)</sup> and Eurachem/CITAC Guide <sup>2)</sup>		
Constituent	Certified value at 20°C and expanded uncertainty (U = k · u <sub>c</sub> ; k = 2)	1'000 mg L <sup>-1</sup> ± 4 mg L <sup>-1</sup>
<b>Selenium</b>	<b>990 mg kg<sup>-1</sup> ± 4 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>1'000 mg L<sup>-1</sup> ± 4 mg L<sup>-1</sup></b>

CRM operations:  

Approving Officer:  

1) ISO Guide 31:2018, "Reference materials - Concepts of certification, labels and accompanying documentation"  
2) ISO Guide 35:2011, "Reference materials - Guidance for manufacturers and assessment of conformity and legitimacy for use"  
3) Eurachem/CITAC Guide, "8.4.2.2002: 'Uncertainty in chemical measurement'"  
4) Bichmann A., Hübner S., Huber M., Meyer P. S. (2016), "The uncertainty of weighing (and related with electronic analytical balances)", Microchimica Acta 148: 153-163  
5) Calculated by combination of the quoted contribution values



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE  
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

**REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

**Fecha de entrega:** 18 / 10 / 2021

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> <i>Teresa Elizabeth Albán Guerrero Sayuri Fernanda Ruiz Illapa</i>
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> <i>Ciencias</i>
<b>Carrera:</b> <i>Bioquímica y Farmacia</i>
<b>Título a optar:</b> <i>Bioquímica Farmacéutica</i>
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>

**LEONARDO  
FABIO MEDINA  
NUSTE**

Firmado digitalmente por  
LEONARDO FABIO  
MEDINA NUSTE  
Fecha: 2021.10.18 15:36:31  
-05'00'



1828-DBRA-UTP-2021