



Concentraciones de glifosato y 2,4-diclorofenoxiacético en granos, hojas y suelos en cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la región San Martín, Perú

Concentrations of glyphosate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in beans, leaves and soils in cocoa (*Theobroma cacao* L.) crops in the San Martin region, Peru

Enrique Navarro^{1*}; José Carlos Rojas²; Richer Garay³; Leopoldo Ríos¹; Fernando Vásquez⁴

1 Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional de San Martín, Ciudad Universitaria, Jr. Amorarca 334, Morales, San Martín, Perú.

2 Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Martín, Ciudad Universitaria, Jr. Amorarca 334, Morales, San Martín, Perú.

3 Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Peruana Unión, Jr. Los Mártires 340, Morales, San Martín, Perú.

4 Facultad de Ingeniería Civil y Arquitectura, Universidad Nacional de San Martín, Ciudad Universitaria, Jr. Amorarca 334, Morales, San Martín, Perú.

* Autor correspondiente: enavarro@unsm.edu.pe (E. Navarro).

ID ORCID de los autores

E. Navarro: <https://orcid.org/0000-0002-9595-8830>

J.C. Rojas: <https://orcid.org/0000-0002-5273-0182>

R. Garay: <https://orcid.org/0000-0002-9517-9853>

L. Ríos: <https://orcid.org/0000-0002-7517-4086>

F. Vásquez: <https://orcid.org/0000-0003-0867-8345>

RESUMEN

El objetivo de la investigación se centró en identificar parcelas cacaoteras con presencia de glifosato y 2,4-diclorofenoxiacético; así como cuantificar estas moléculas en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao en 16 zonas productoras de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la región San Martín. Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC). Encontrándose concentraciones de glifosato en suelos entre 0,1751 y 0,5925 ppm; por su parte en hojas de cacao se encontraron concentraciones entre 0,0015 y 0,2639 ppm. En granos secos fermentados de cacao se obtuvieron valores de glifosato entre 0,0427 y 0,5518 ppm. En lo referente a valores de 2,4-diclorofenoxiacético, los suelos presentaron concentraciones desde 0,2248 hasta 0,7201 ppm; mientras que en hojas se reportaron valores entre 0,0011 y 0,3307 ppm. En granos secos de cacao la cuantificación fue desde 0,0708 hasta 0,6491 ppm. Se estableció que existen contrastes significativos ($p < 0,05$) entre las cantidades de glifosato y 2,4-diclorofenoxiacético en suelos, hojas y granos secos de cacao. Afinando que los valores de glifosato y 2,4-diclorofenoxiacético encontrados en granos secos de cacao en el 93,75% de las parcelas superan los LMR que dicta la NTS N° 128-2016/MINSA/DIGESA que es de 0,1 ppm para dichos analitos.

Palabras clave: Herbicida; HPLC; glifosato; 2,4-diclorofenoxiacético; granos de cacao.

ABSTRACT

The objective of the research was to identify cocoa plots with the presence of glyphosate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and to quantify these molecules in soils, leaves and dry fermented cocoa beans in 16 cocoa (*Theobroma cacao* L.) producing areas in the San Martin region. The samples were analyzed by ultra high performance liquid chromatography (UHPLC). Glyphosate concentrations in soils ranged from 0.1751 to 0.5925 ppm, while concentrations in cocoa leaves ranged from 0.0015 to 0.2639 ppm. In dry fermented cocoa beans, glyphosate values between 0.0427 and 0.5518 ppm were obtained. Regarding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid values, soil concentrations ranged from 0.2248 to 0.7201 ppm; while in leaves, values between 0.0011 and 0.3307 ppm were reported. In dry cocoa beans, quantification ranged from 0.0708 to 0.6491 ppm. It was established that there are significant contrasts ($p < 0.05$) between the amounts of glyphosate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soils, leaves and dry cocoa beans. The values of glyphosate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid found in dry cocoa beans in 93.75% of the plots exceed the MRLs dictated by NTS No 128-2016/MINSA/DIGESA, which is 0.1 ppm for these analytes.

Keywords: Herbicide; HPLC; glyphosate; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; cocoa beans.

Recibido: 12-11-2023.

Aceptado: 21-02-2024.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los lugares más importantes de orígenes del cacao (*Theobroma cacao* L.), con el 60% de las variedades de este producto del mundo, al igual que el café, se ha convertido en una de las materias primas peruanas de mejor calidad mundial, generando valor agregado de primerísima calidad en las fábricas de chocolate. El cacao es un producto muy apreciado y ese aspecto, el comercio mundial diferencia dos mercados principales para el cacao en grano: el de productos básicos y el de especialidad, en el último tipo se encuentra el cacao fino o de aroma. El cacao especial es un mercado en crecimiento caracterizado por precios más altos, principalmente debido a la promoción de prácticas sustentables (Viteri et al., 2023). La Organización Internacional del Cacao (ICCO) ha reconocido al Perú como un país en el cual se origina y se exporta un cacao fino y de aroma. En los últimos años, el cacao peruano ha ganado numerosos premios internacionales y es reconocido como uno de los mejores cacaos del mundo. Como resultado, algunas de las fábricas de chocolate más exclusivas de Francia, Bélgica y Suiza utilizan este cacao para elaborar sus productos. El cacao peruano se cultiva en las laderas occidentales inferiores de los Andes y en las selvas peruanas a altitudes entre 300 y 900 metros. Las principales zonas productoras de este agradable grano son Cusco, Amazonas, San Martín, Ayacucho, Junín y Piura, representando el 80% de la producción total del país. Los principales mercados de exportación son Estados Unidos y la Unión Europea (Países Bajos, Italia, Bélgica y Alemania) (MIDAGRI, 2020).

Los granos de cacao se producen a partir del árbol del cacao y son un importante producto agrícola mundial utilizado en la industria del chocolate y en alimentos como bebidas, galletas, bizcochos y helados (Mohamed et al., 2020). Además, esta planta agrícola comercial sustenta de manera directa la economía para una mejora de la calidad de vida de millones de personas a nivel mundial. Las economías de muchas naciones productoras de cacao, particularmente las de los países en desarrollo, se sustentan en los ingresos por exportaciones de cacao. Sin embargo, para garantizar rendimientos satisfactorios, la planta suele tratarse intensamente con pesticidas porque es vulnerable a enfermedades y ataques de plagas. Aunque los pesticidas ayudan a proteger la planta del cacao, también es probable una contaminación ambiental involuntaria (Boakye, Stanley & White, 2023). Por lo tanto, el cultivo del cacao crea y promueve una buena fuente de ingresos económicos para los productores dedicados a este producto en la región de San Martín; Sin embargo, los productores de cacao utilizan herbicidas, principalmente glifosato y ácido 2,4-diclorofenoxiacético, para controlar las

malas hierbas en sus campos. El glifosato representa al herbicida con mayor aplicación a nivel mundial. El éxito comercial de esta molécula se debe a su no selectividad y a su acción, que supuestamente se dirigiría a rutas biosintéticas específicas que se encuentran principalmente en las plantas (Bataillard, et al., 2020). También puede ser bastante tóxico para macrófitos nativos (Sesin, et al., 2021). Por otra parte, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y su uso extensivo en la agricultura es la principal fuente de contaminación del suelo, agua e incluso algunas propias plantas no seleccionadas (Martínez y Martínez, 2018). El 2,4-D se viene utilizado ampliamente en la eliminación de muchos tipos de malezas que poseen hojas anchas, pastos y otras monocotiledóneas (Zhen, et al., 2019). Sin embargo, ha habido una preocupación creciente en varios sectores de la agroindustria y en los gobiernos de todo el mundo sobre el uso de agroquímicos y sus efectos nocivos sobre el medio ambiente, los trabajadores agrícolas y los consumidores. El uso de pesticidas en el mundo representa un peligro para la salud del ser humano y deterioro del ambiente (Chávez et al., 2021). Esto es bastante preocupante actualmente, debido a esto los países importadores de pasta o granos de cacao vienen implementando rigurosos controles en los puertos de desembarque de los mismos monitoreando los límites máximos permisibles de sustancias químicas provenientes de la utilización de plaguicidas en la producción agrícola, especialmente del cacao. La demanda de pesticidas ha ido en aumento para mejorar la producción y la calidad de los alimentos, garantizando así la seguridad alimentaria (Eta et al., 2023).

Durante la última década, el mercado de productos orgánicos de chocolate y cacao ha experimentado un crecimiento significativo con una tasa media anual del 7,5 % (MIDAGRI, 2020). Esta tendencia de crecimiento, se espera que se extienda en el futuro, especialmente en cuanto a las exportaciones. Sin embargo, el problema radica en la presencia de pesticidas, como el herbicida 2,4-D y el glifosato, que están contaminando el cacao y el chocolate. Esto ha llevado a un aumento en el rechazo de lotes contaminados en los puertos de destino europeos y en otros lugares. Con estas premisas, el objetivo de esta investigación buscó cuantificar las concentraciones de glifosato y 2,4-D tanto en los suelos, hojas y frutos de cacao secos fermentados en las zonas productoras del mismo, así como su georreferenciación en la región San Martín, con la finalidad de poder tomar acciones pertinentes por parte de las autoridades agrarias y no limitar las exportaciones de cacao, lo cual llevaría a un retroceso económico para muchos agricultores y toda la cadena de este cultivo a nivel nacional.

METODOLOGÍA

Área de estudio y muestreo

El trabajo de campo (toma de muestras) se realizó en plantaciones de cacao ubicadas en la Región San

Martín, Perú, distribuidas en las provincias de Lamas, San Martín, Huallaga, El Dorado y Mariscal Cáceres. Las actividades de trabajo de campo, es

decir la recolección de muestras (suelos, granos y hojas de cacao) en las parcelas cacaoteras seleccionadas, así como la georeferenciación de las mismas fueron ejecutadas durante un tiempo de tres meses (noviembre, diciembre del 2021, enero del 2022); y el segundo período de desarrollo fue el trabajo de los ensayos de laboratorio mediante la cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC), durante los meses de junio y julio del 2022. Este último período se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto.

Las muestras de suelos fueron extraídas de acuerdo a lo recomendado por Hintze et al. (2021) y Ouyang et al. (2021), compuestas por 32 monolitos de tierra (02 monolitos de suelo por cada zona) de 25 cm x 25 cm de área y 30 cm de calado. Se colectaron muestras de suelo de 0 a 5 cm; 5 a 10 cm y de 10 a 20 cm, conseguidas de los sembríos de cacao. Las hojas se extrajeron directamente de las plantas de cacao, colocándolas en sobres tipo manila (30 hojas de diferentes plantas por parcela). Los granos beneficiados (secos fermentados) fueron recolectados 250 g de muestra por cada parcela de sembrío de cacao en la zona de intervención. Estas muestras fueron empaquetadas en bolsas de polietileno con cierre tipo ziploc rotuladas. Las variedades de cacao que predominan en la zona es el criollo y los clones CCN-51 y el ICS-95. Tanto las muestras de hojas y de granos de cacao debidamente envasadas fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C para su posterior procesamiento y ensayos siguientes.

Identificación y georeferenciación de las parcelas productoras de cacao

Durante la recolección de las muestras, se realizó, además, la georeferenciación de cada parcela intervenida, para ello se utilizó un equipo de posicionamiento satelital Garmin; Etrex 32X (GPS) con el cual se obtuvieron las coordenadas geográficas mediante el sistema geodésico mundial; además de la altitud (msnm) en la cual se encuentran dichas parcelas cacaoteras. Debe tenerse en cuenta también que se obtuvo la información de la superficie cultivada de cacao por cada zona agrícola.

Obtención de estándares para la determinación de las curvas analíticas

Para la determinación de las curvas patrones se utilizaron el estándar de calibración glifosato $\geq 98,5\%$ pureza grado HPLC (Sigma Aldrich, lote # BCCC7102) y el estándar de calibración 2,4-D $\geq 99,0\%$ pureza grado HPLC (Sigma Aldrich, lote # BCCD8084); los cuales se pesaron 20,5 mg por cada uno de los estándares por separados y fueron llevados a fioles de 100 mL, añadiéndose 50 mL de agua ultrapura, luego se sonicó por 10 minutos, (obteniendo una solución madre con concentración de 410 ppm). Se tomaron una primera alícuota de 100 μ L de esta solución y se llevó a una fiola de 10 mL (enrasándola con agua ultrapura), para obtener una solución stock de 4,1 ppm (4100 ppb) luego se tomaron alícuotas de cada estándar para obtener

los patrones para las curvas de calibraciones añadiéndolas en cada caso 10 mL de agua ultrapura en fioles de 20 mL, tal como la Tabla 1 muestra al detalle.

Tabla 1

Concentraciones de calibración encontradas para las muestras patrones (glifosato y 2,4-D)

Alícuota (solución stock de 4100 ppb)	Volumen final (mL)	Puntos de calibración / Concentración (ppb)	
0,125 mL	10,125	P1	51,25
0,25 mL	10,25	P2	102,5
0,5 mL	10,5	P3	205
1,0 mL	11,0	P4	410
2,5 mL	12,5	P5	1025
5 mL	15,0	P6	2050
10 mL	20,0	P7	4100

Luego se inyectaron cada concentración de los estándares en el UHPLC, registrándose de manera exacta y precisa el tiempo de retención (minutos), mili absorbancia (mAU) y el área debajo la curva (mAU*min).

Preparación de las muestras

Con la finalidad de obtener tamaños de muestras mucho más pequeñas y aumentar la superficie de extracción de las mismas y facilitar así la detección y cuantificación de los analitos, las hojas almacenadas se sometieron a un proceso de triturado, utilizando para ello una licuadora. Los granos secos fermentados de cacao fueron sometidos a molienda, utilizando para este proceso un molino de discos manual. Estos procedimientos permitieron obtener las muestras en tamaños de partículas adecuadas para los ensayos posteriores. En el caso de las muestras de suelo, éstos fueron preparadas directamente sin ningún proceso de trituración. Las metodologías aplicadas para la preparación de las muestras y los ensayos en el UHPLC fueron adaptadas en gran parte de las propuestas por Rangel (2017), Delmonico et al. (2014) y Casado et al. (2019).

Muestras para análisis de glifosato (N-fosfonometilglicina) (C₃H₈NO₅P)

5 mL de agua destilada ultrapura fueron mezclados con 1 g de muestra (suelos, hojas o granos) en un agitador vortex de mesa por 30 min a 25 \pm 1 °C. Seguidamente, se centrifugó a 3500 rpm por 15 min y se rescató el primer sobrenadante. Se agregó 12 mL de una solución NaOH 1N al sedimento en tubos Falcon de 15 mL y se mezcló en el agitador vortex de mesa por 30 min a 25 \pm 1 °C. Seguidamente se centrifugó a 3500 rpm por 15 min y se rescató el segundo sobrenadante. Posteriormente fueron combinados los sobrenadantes y se les agregó una solución de H₂SO₄ al 20% (0,2 mL por cada mL de extracto) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de nylon (0,45 μ m, 33 mm) y se realizó una extracción en fase sólida empleando cartuchos Bond Elut EnvirElut (500 mg, 6 mL) preparados previamente con 2 mL de metanol, 4 mL de NaOH 0,5 M y 2 mL de agua, se aplicaron 6 mL del sobrenadante filtrado. Los compuestos fueron eluidos con 1 mL de HCl en acetonitrilo 0,5 M y se evaporaron completamente.

El residuo conseguido se reconstituyó en 2 mL de agua y fue sometido a un proceso de derivatización, que se detalla a continuación:

Se tomaron 500 µL de la muestra reconstituida, se les adicionó 250 µL de buffer de fosfatos 0,4 M (Fosfato de sodio monobásico anhidro + Di-sodio hidrogenofosfato anhidro) a pH 11, ajustado con NaOH 1M, y 100 µL de una solución de p-toluensulfonilo en acetonitrilo a 0,01 ppm. Consecutivamente, la mezcla se calentó a baño maría a 35 °C de temperatura, durante 5 min. Finalmente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Las soluciones fueron inyectadas al HPLC en viales de 1,5 mL con volúmenes de inyección de 25 µL.

Muestras para análisis de 2,4-Diclorofenoxiacético (C₈H₆Cl₂O₃)

Se pesaron las muestras de suelos, hojas trituradas o granos fermentados secos de cacao molidos (1 gramo por muestra). Posteriormente se añadió un volumen de 5 mL de una solución de NaOH 0,01N, se agitó en vortex por 2 minutos, seguidamente se llevó a baño de ultrasonido por 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de extracción se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos, se tomó una alícuota de 2 mL del sobrenadante y se eluyó en el cartucho de extracción de fase sólida (Strata C18-E, 55 µm, 70 Å; 100 mg / 3 mL marca Phenomenex). Luego se eluyó nuevamente con 1 mL de la solución de Metanol / Eter tert-butilmetílico en proporción 1 a 9 respectivamente, esta fracción de la elución se colectó en un vial y se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno. Se realizó luego una reconstitución utilizando para ello 1,5 mL agua ultrapura, para luego ser filtrado mediante un filtro de jeringa (membrana de nylon de 0,45 µm x 13 mm). Esta solución filtrada se colocó en un vial para inyectar en el sistema UHPLC para su tratamiento y lectura. Las soluciones fueron inyectadas en viales de 1,5 mL con volúmenes de inyección de 25 µL.

Metodología cromatográfica aplicada

La selectividad de un método analítico depende de la capacidad del sistema analítico para separar los componentes de la muestra entre sí. Sin embargo, a veces el simple hecho de utilizar la precisión de la masa, el tiempo de retención y el patrón de

fragmentación da como resultado una identificación múltiple de compuestos, ya que una muestra puede contener miles de componentes individuales (Hisyam, 2022). El proceso de extracción se desarrolló en un régimen de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia (UHPLC) con un equipo modelo UltiMate 3000 marca Thermo Scientific, compuesto por una bomba cuaternaria, automuestreador con temperatura regulable en la bandeja de muestras, con horno de columnas y un detector de arreglo de diodos. La separación se efectuó en columnas cromatográficas RP-C18. Todos los ensayos de cromatografía líquida para cada muestra se realizaron por triplicado. Las condiciones cromatográficas aplicadas en la determinación de glifosato y 2,4-Diclorofenoxiacético, detallamos en la Tabla 2.

Cuantificación de glifosato y 2,4-Diclorofenoxiacético

Para medir los residuos de herbicidas glifosato y 2,4-Diclorofenoxiacético en las muestras de suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao sometidos a cromatografía líquida de ultra alta eficiencia, se obtuvo primero la ecuación de la curva de calibración:

$$Y = mX + b; \quad r^2 \quad (1)$$

Donde:

Y: Área del pico cromatográfico (mAU*min)

X: Concentración (ppb)

m: Pendiente de la curva (*Slope*)

b: Término independiente (*Offset*)

r²: coeficiente de correlación, no menor de 0,998.

Finalmente se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. 2,4-D} = \frac{\text{Conc.}_{LC} \times V_f}{W_m \times 1000} \times \text{FD} \quad (2)$$

Donde:

Conc. 2,4-D: Concentración de glifosato o 2,4-D en la muestra (mg/kg o ppm)

Conc. _{LC}: Concentración del analito interpolado de la curva de calibración (ppb)

V_f: Volumen final de reconstitución (mL)

FD: Factor de dilución de la muestra (V_{alícuota}/V_{total})

W_m: Peso de la muestra (g).

Tabla 2

Condiciones cromatográficas para la determinación de glifosato y 2,4-D

	Glifosato	2,4-D
Columna analítica	Hypersil ODS C18; 150 mm x 4,6 mm; 5 µm	RP-C18, Luna 5 µm Phenyl-Hexyl 150 mm x 4,6 mm
Fase móvil	88% de (A) buffer KH ₂ PO ₄ y 12% de (B) acetonitrilo.	70% de (A) ácido acético al 0,1% en acetonitrilo y 30% de (B) ácido acético al 0,1% en agua ultrapura.
Flujo de fase móvil	1,0 mL/min	
T° de columna	30 °C	
Longitud de onda	240 nm	283 nm
Volumen de inyección	25 µL	
T° en la bandeja de muestras	20 °C	
Tiempo de corrida	20 min	10 min

Evaluación de las diferentes concentraciones de glifosato y 2,4-D en suelos, hojas y granos de cacao

Con la finalidad de comparar las medias aritméticas de todos los parámetros en estudio (glifosato y 2,4-D en suelos, hojas y granos de cacao), se realizó el análisis de varianza (ANOVA), de esta manera se pudo conocer si los niveles de estos analitos son o no diferentes estadísticamente de una parcela a otra, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ (Prueba de Tukey al 5%), utilizando para ello un

diseño completo al azar (DCA). La interpretación y discusión de los datos obtenidos fueron realizados comparándolos con datos reportados en la literatura científica y las normas regulativas como la Resolución Ministerial N° 1006-2016/MINSA "Límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas de uso agrícola en alimentos de consumo humano" y el Reglamento (UE) 2019/1791 de la Comisión Europea sobre LMR permitas de 2,4-D en productos agrícolas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y georreferenciación de parcelas productoras de cacao

En la Tabla 3 se muestran las ubicaciones de las parcelas cacaoteras de la región San Martín; plantaciones de las cuales fueron tomadas las muestras de suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao, georreferenciadas en el sistema de coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator).

Tabla 3

Ubicación de las parcelas cacaoteras en la Región San Martín

Parcela	Provincia	Localidad	Coordenadas UTM WGS84	Altitud (m.s.n.m.)
1	Lamas	Barranquita	18M E: 386441 S: 9308617	153
2		Tabalosos	18M E: 318164 S: 9294851	556
3		Nuevo Celendín	18M E: 330240 S: 9271596	795
4		Santiago de Borja	18M E: 394465 S: 9312782	158
5		Sangamayoc	18M E: 373100 S: 9307112	166
6		Pamashoto	18M E: 328326 S: 9297745	711
7	San Martín	Chazuta	18M E: 373600 S: 9272669	248
8		Pasiqihui	18M E: 375805 S: 9273980	204
9	Huallaga	San Regis	18M E: 300941 S: 9241477	340
10		San Miguel	18M E: 302680 S: 9234307	332
11		Piscocoyacu	18M E: 301763 S: 9227029	378
12	El Dorado	San José de Sisa	18M E: 312777 S: 9265593	339
13	Mariscal Cáceres	Campanilla	18M E: 315447 S: 9175713	324
14		Huicungo	18M E: 305138 S: 9189163	311
15		Villa Prado	18M E: 312162 S: 9210715	267
16		Costa Rica	18M E: 316988 S: 9192555	353

Las áreas cultivadas intervenidas en el estudio pueden comprenderse como parcelas de mediano tamaño, ya que se encuentran entre las 1,5 Ha hasta un tamaño de 14,0 Ha de superficies cultivables de cacaoales. Las zonas se encuentran ubicadas en la

región de Selva Baja, ya que se encuentran en altitud en altitud promedio de 560 m.s.n.m. Con los datos de la Tabla 3, se procedió a trazar las ubicaciones espaciales georreferenciadas de las 16 parcelas cacaoteras consideradas en la investigación, las cuales se muestran en la Figura 1.

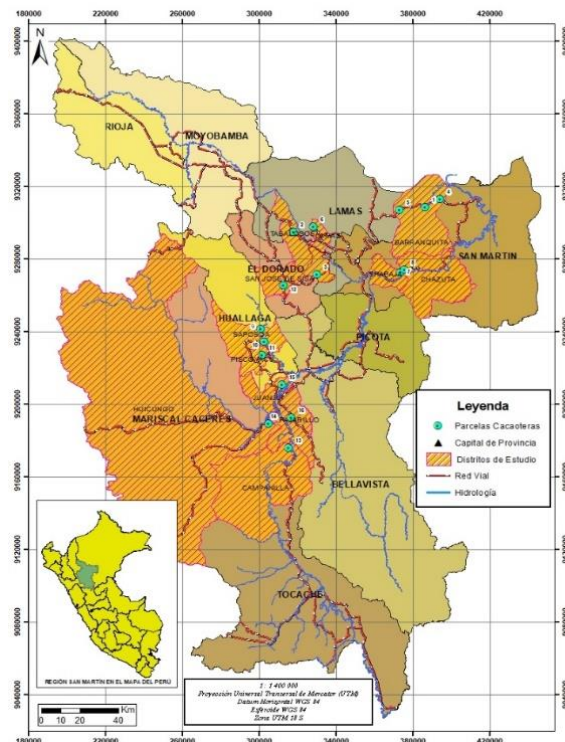


Figura 1. Ubicación en la región San Martín de 16 parcelas cacaoteras consideradas en el estudio.

Curvas analíticas y cromatogramas de los estándares de calibración

Las curvas analíticas se muestran en las Figuras 2 y 3; las cuales se obtuvieron con los estándares de glifosato y 2,4-Diclorofenoxiacético a las concentraciones de 51,25; 102,50; 205; 410; 1025; 2050 y 4100 ppb luego de ser inyectados y procesados en el cromatógrafo líquido (UHPLC) por separados.

En las Figuras 4 y 5 se muestran los cromatogramas UHPLC, obtenido al inyectar 25 μ L estándares de glifosato y 2,4-Diclorofenoxiacético a 2050 y 4100 ppb respectivamente, obteniendo tiempos de retenciones de 12,425 minutos para el glifosato y de 2,170 minutos para el 2,4-D.

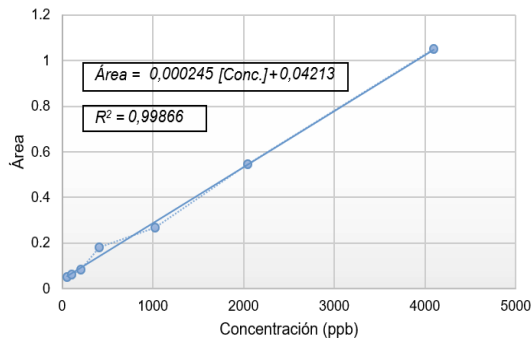


Figura 2. Curva analítica para glifosato.

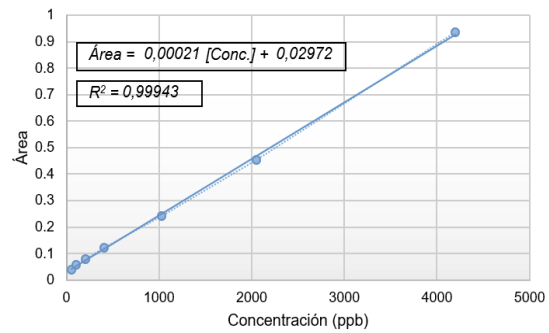


Figura 3. Curva analítica para 2,4-Diclorofenoxiacético.

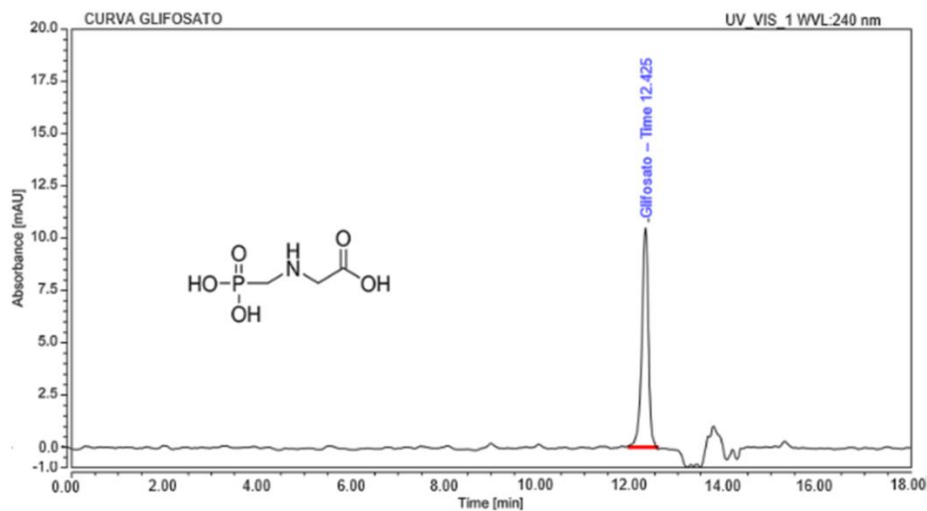


Figura 4. Cromatograma de UHPLC estándar de glifosato.

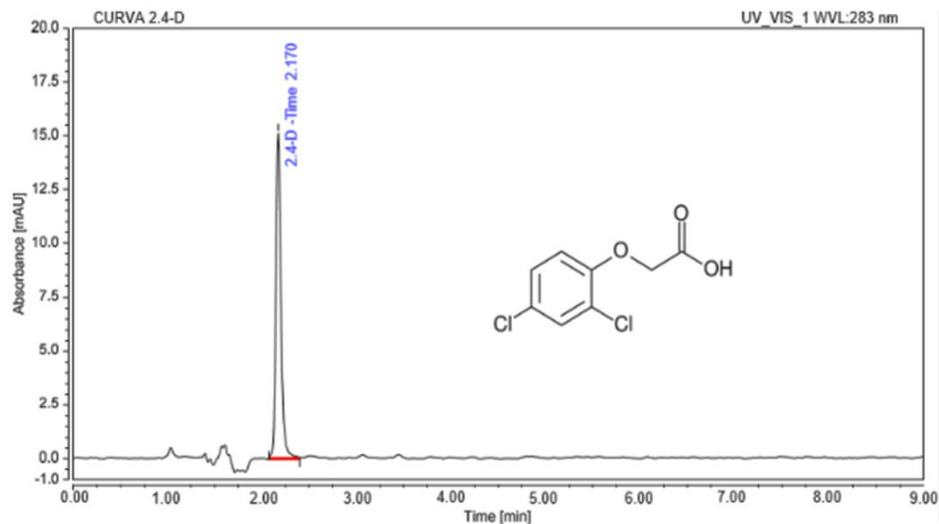


Figura 5. Cromatograma de UHPLC estándar de 2,4-Diclorofenoxiacético.

Concentraciones de glifosato en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao

Los valores promedios de la cuantificación de herbicida glifosato en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao expresados en partes por millón (ppm o mg/kg) en cada una de las dieciséis (16) parcelas cacaoteras de la región San Martín que fueron seleccionadas para el estudio analizadas mediante UHPLC, se muestran en la Tabla 4 y se grafican en la Figura 6.

Fueron encontradas concentraciones de glifosato en suelos de todas las 16 parcelas cacaoteras de la región San Martín, con valores que van desde 0,1751 ppm (Barranquita) hasta 0,5925 ppm (Villa Prado), valores que podrían compararse con los reportados por Rangel (2017), quien encontró en suelos agrícolas (Estado de Veracruz, México) entre 0,555 a 2,383 ppm de glifosato. Sin embargo, otras investigaciones cuantificaron valores mucho más elevados de glifosato en suelos agrícolas como en el estado de Nuevo León, México con hasta 11 430 ppm

(Cano et al., 2022) y en el departamento de Arauca, Colombia con valores de hasta 10,95 ppm (Bernal, 2020). En cuanto a concentraciones de este herbicida en hojas de cacao, se encontraron en 12 parcelas cacaoteras valores desde 0,0015 ppm (Sangamayoc) hasta 0,2639 ppm (Chazuta) y en 04 parcelas valores no cuantificables. Estos valores (NC) se entienden que, al aplicar los ensayos de cromatografía líquida, ésta si detecta al analito, sin embargo, al ser cantidades muy pequeñas, éstas no pueden calcularse matemáticamente y son consideradas por debajo del límite de cuantificación de la metodología empleada. Gaón (2013) reportó valores de glifosato entre 0,60 ppm y 4,20 ppm en tallos de cacao en la provincia de Sucumbíos, Ecuador. Los granos fermentados secos de cacao analizados presentaron concentraciones de glifosato en todas las zonas estudiadas (16), con valores que van desde los 0,0427 ppm (Barranquita) hasta 0,5518 ppm (San Regis); concentraciones por debajo de los reportados Gaón (2013) en granos de cacao en la provincia de Sucumbíos, Ecuador, con valores de entre 5,50 ppm y 9,30 ppm. Puede indicarse entonces que, el 93,75% (15/16) de las muestras

analizadas superan los límites máximos de residuos (LMR) dispuesto en la Resolución Ministerial N° 1006-2016/MINSA que aprueba la NTS N° 128-2016/MINSA/DIGESA “Norma Sanitaria que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) de plaguicidas de uso agrícola en alimentos de consumo humano”. Esta Norma Sanitaria no reporta los LMR específicamente de glifosato para granos de cacao, sin embargo, sí lo podemos comparar con los valores máximos de residuos de este herbicida aceptados para arroz descascarillado (*Oryza sativa*) que es de 0,1 ppm y para los granos de café (*Coffea arabica*) de 0,05 ppm. El glifosato, como ingrediente activo y sus preparados, tiene un efecto tóxico en las células humanas en condiciones in vitro y está relacionado con diferentes tipos de cáncer, pero está más vinculado con el linfoma no Hodgkin, según estudios científicos publicados en la literatura mundial (González et al., 2023), sin embargo, este posible impacto sobre la salud en el ser humano, va a depender de la cantidad de glifosato que se encuentre presente, la duración y periodicidad de la exposición (Gandhi et al., 2021).

Tabla 4
Contenido de glifosato en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao en la región San Martín

Parcela	Localidad	Concentración glifosato (ppm)		
		Suelos	Hojas	Granos
1	Barranquita	0,1751 ± 0,01818	0,1069 ± 0,01707	0,0427 ± 0,00531
2	Tabalosos	0,1961 ± 0,00443	NC	0,1331 ± 0,01088
3	Nuevo Celendín	0,2129 ± 0,02623	0,0595 ± 0,00574	0,2581 ± 0,00826
4	Santiago de Borja	0,3097 ± 0,02366	NC	0,2453 ± 0,01264
5	Sangamayoc	0,3317 ± 0,00519	0,0015 ± 0,00268	0,2496 ± 0,01245
6	Pamashto	0,3415 ± 0,03253	NC	0,2737 ± 0,00811
7	Chazuta	0,3337 ± 0,19585	0,2639 ± 0,05007	0,3408 ± 0,01480
8	Pasiqihui	0,4395 ± 0,05367	0,0870 ± 0,00122	0,5352 ± 0,00778
9	San Regis	0,3258 ± 0,08616	0,0570 ± 0,01115	0,5518 ± 0,02143
10	San Miguel	0,3617 ± 0,05762	0,0470 ± 0,01333	0,4581 ± 0,06493
11	Piscoyacu	0,3660 ± 0,01704	0,2448 ± 0,00260	0,2481 ± 0,00411
12	San José de Sisa	0,3676 ± 0,01890	0,2026 ± 0,03775	0,3793 ± 0,02366
13	Campanilla	0,4045 ± 0,02486	0,0535 ± 0,02077	0,2920 ± 0,00788
14	Huicungo	0,3108 ± 0,10509	0,2388 ± 0,01245	0,2041 ± 0,00627
15	Villa Prado	0,5925 ± 0,11864	NC	0,3704 ± 0,00872
16	Costa Rica	0,4445 ± 0,16605	0,1603 ± 0,04821	0,3171 ± 0,00530

Los valores representan el promedio ± Desviación estándar; n = 3; NC = No cuantificable.

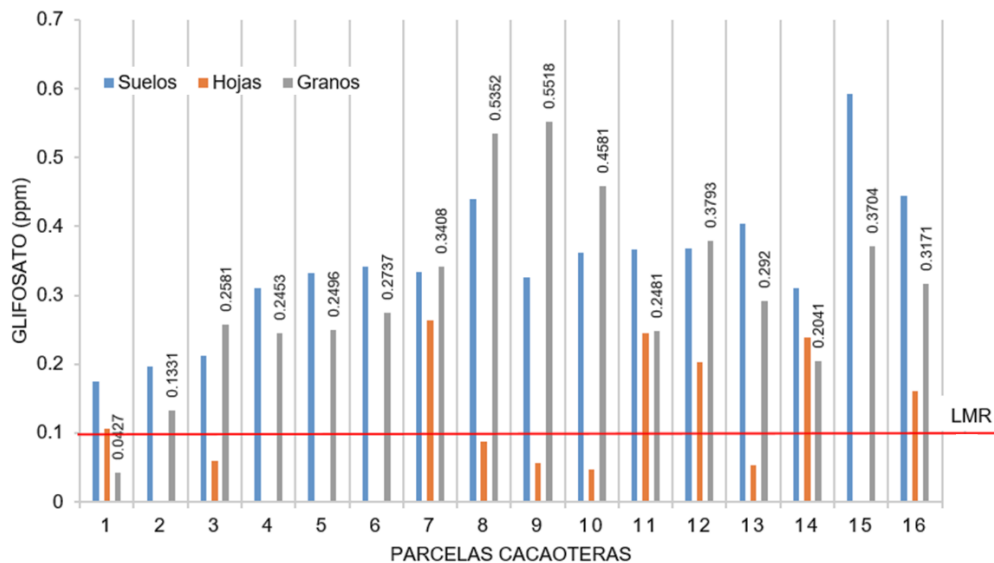


Figura 6. Concentraciones promedio de **glifosato** en suelos, hojas y granos de cacao en parcelas cacaoteras de la región San Martín. LMR: Límite Máximo de Residuos (0,1 ppm).

Concentraciones de 2,4-Diclorofenoxiacético en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao

En la Tabla 5 se detallan los valores promedios de la cuantificación de 2,4-diclorofenoxiacético encontrados en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao expresados en partes por millón (ppm o mg/kg) en cada una de las dieciséis (16) parcelas cacaoteras de la región San Martín que fueron seleccionadas para el estudio analizadas mediante UHPLC, además en la Figura 7 son graficados estos datos. Al igual que el glifosato, se detectaron y cuantificaron 2,4-D en suelos de las 16 parcelas cacaoteras estudiadas de la región San Martín, encontrando valores desde 0,2248 ppm (Barranquita) hasta 0,7201 ppm (Villa Prado), estas concentraciones son cercanas a los reportados en suelos de uso agrícola en el estado de Veracruz, México de 0,129 ppm hasta 0,526 ppm de 2,4-D (Rangel, 2017). Si observamos las concentraciones

encontradas de 2,4-D en las hojas de cacao, se obtuvieron valores de 0,0011 ppm hasta 0,3307 ppm, no encontrando este analito (NC) en hojas de 04 parcelas cacaoteras.

Todas las muestras de granos fermentados secos de cacao analizadas de las 16 parcelas cacaoteras reportaron concentraciones de 2,4-D con cantidades desde 0,0708 ppm (Barranquita) hasta 0,6491 ppm (San Regis); dichas zonas de cultivos coinciden con valores mínimos y máximos encontrados también en la cuantificación de glifosato. Valores muy similares fueron encontrados por Villanueva et al. (2023) en la misma provincia del Huallaga, concentraciones de hasta 0,956 ppm de 2,4-D; además en las zonas de Tarapoto, Moyobamba, Juanjuí y Ucayali, reportaron valores de hasta 0,216; 0,077; 0,093 y 0,201 ppm respectivamente. Ancayay (2022) encontró concentraciones de 2,4-D desde 0,01 ppm hasta 0,03 ppm en granos de cacao en la provincia del Guayas en Ecuador.

Tabla 5

Contenido de 2,4-D en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao en la región San Martín

Parcela	Localidad	Concentración de 2,4-D (ppm)		
		Suelos	Hojas	Granos
1	Barranquita	0,2248 ± 0,02545	0,1462 ± 0,02100	0,0708 ± 0,00538
2	Tabalosos	0,2495 ± 0,00059	NC	0,1718 ± 0,01123
3	Nuevo Celendín	0,2674 ± 0,02912	0,0910 ± 0,00818	0,3230 ± 0,01040
4	Santiago de Borja	0,3811 ± 0,02536	NC	0,3134 ± 0,00821
5	Sangamayoc	0,4023 ± 0,00889	0,0011 ± 0,01560	0,3147 ± 0,01526
6	Pamashto	0,4156 ± 0,03649	NC	0,3425 ± 0,01006
7	Chazuta	0,4057 ± 0,22646	0,3307 ± 0,05882	0,4208 ± 0,02538
8	Pasiqihui	0,5342 ± 0,05798	0,1246 ± 0,00199	0,6490 ± 0,00941
9	San Regis	0,3996 ± 0,10314	0,0889 ± 0,01214	0,6491 ± 0,01356
10	San Miguel	0,4467 ± 0,05723	0,0788 ± 0,01430	0,5563 ± 0,07383
11	Piscoyacu	0,4421 ± 0,02526	0,3051 ± 0,00588	0,3106 ± 0,00649
12	San José de Sisa	0,4501 ± 0,02632	0,2608 ± 0,04338	0,4580 ± 0,03301
13	Campanilla	0,4891 ± 0,03098	0,0856 ± 0,02180	0,3582 ± 0,01133
14	Huicungo	0,3794 ± 0,12024	0,2985 ± 0,01940	0,2583 ± 0,00705
15	Villa Prado	0,7201 ± 0,14263	NC	0,4572 ± 0,01143
16	Costa Rica	0,5368 ± 0,19457	0,2109 ± 0,05631	0,3889 ± 0,00700

Los valores representan el promedio ± Desviación estándar; n=3; NC=No cuantificable.

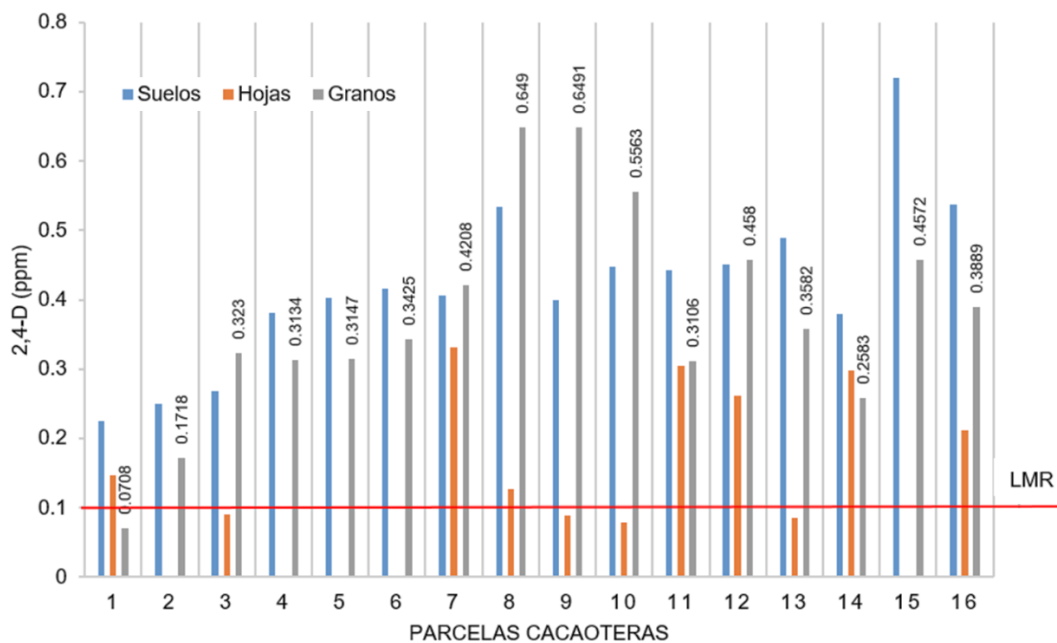


Figura 7. Concentraciones promedias de 2,4-D en suelos, hojas y granos de cacao en parcelas cacaoteras de la región San Martín. LMR: Límite Máximo de Residuos (0,1 ppm).

Debemos indicar entonces que las concentraciones de 2,4-D encontrados en 15 de las 16 muestras de cacao, superan los LMR para cacao en grano (*Theobroma cacao* L.) que establece el “Reglamento (UE) 2019/1791 de la Comisión Europea”, el cual limita a 0,1 mg/kg (ppm) de 2,4-D en el mencionado alimento. Este herbicida (2,4-D) es uno de los más manejados a nivel mundial, el cual se emplea para controlar las malezas en países tanto de América Latina, como en los Estados Unidos (Freisthler et al., 2022). Este agroquímico es un competidor de la hormona auxina, aplicado para limitar el crecimiento de malezas de hoja ancha en el cultivo de cereales, granos y caña de azúcar, además de pastos (Brucha et al., 2021).

Evaluación de diferencias significativas entre las concentraciones de glifosato y 2,4-diclorofenoxiacético en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao

Para realizar la comparación de las concentraciones de glifosato y 2,4-D entre las muestras de suelos, hojas y granos secos fermentados de cacao por parcelas y de esta manera establecer si existe o no diferencias significativas entre las mismas. Los datos primarios de las Tablas 4 y 5 fueron analizados mediante la comparación de medias (ANOVA) con la Prueba de Tukey al 5%; y se presentan en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6

Concentraciones promedio de glifosato en cacao y su cotejo estadístico mediante la prueba de Tukey

Parcela	Concentración glifosato (ppm)		
	Suelos	Hojas	Granos
1	0,1751 C	0,1069 CD	0,0427 J
2	0,1961 BC	NC E	0,1331 I
3	0,2129 BC	0,0595 DE	0,2581 FGH
4	0,3097 BC	NC E	0,2453 GH
5	0,3317 BC	0,0015 E	0,2496 GH
6	0,3415 BC	NC E	0,2737 FG
7	0,3337 BC	0,2639 A	0,3408 CDE
8	0,4395 AB	0,0870 D	0,5352 A
9	0,3258 BC	0,0570 DE	0,5518 A
10	0,3617 ABC	0,0470 DE	0,4581 B
11	0,366 ABC	0,2448 A	0,2481 GH
12	0,3676 ABC	0,2026 AB	0,3793 C
13	0,4045 ABC	0,0535 DE	0,292 EFG
14	0,3108 BC	0,2388 A	0,2041 H
15	0,5925 A	NC E	0,3704 CD
16	0,4445 AB	0,1603 BC	0,3171 DEF

Medias con igual letra en una misma columna son significativamente iguales ($p > 0,05$).

Los resultados obtenidos para la prueba de Tukey demuestran que, en casi todos los valores, tanto en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao (para glifosato y 2,4-D), son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). En varias zonas agrícolas de la región de San Martín, se ha descubierto que los agricultores dependen en gran medida del uso de agroquímicos para proteger sus cultivos. La mayoría de los agricultores que utilizan regularmente herbicidas y pesticidas afirman que estas sustancias son cruciales para obtener mejores rendimientos, lo que determina la fuerte dependencia entre pesticidas y agricultores. Debemos entonces tener bastante fiscalización en los granos de cacao que son procesados y/o comercializados provenientes de

parcelas cuyos resultados no han sido favorables, ya que la NTS N° 128-2016/MINSA/DIGESA sostiene “Cualquier alimento que exceda los límites máximos de residuos (LMR) especificados en esta norma de sanidad se considera riesgoso y no apto para el consumo humano y la autoridad competente deberá tomar las medidas de seguridad sanitaria adecuadas para proteger la vida y la salud de los consumidores”.

Tabla 7

Concentraciones promedio de 2,4-D en cacao y su cotejo estadístico mediante la prueba de Tukey

Parcela	concentración de 2,4-d (ppm)		
	suelos	hojas	granos
1	0,2248 C	0,1462 CD	0,0708 I
2	0,2495 BC	NC F	0,1718 H
3	0,2674 BC	0,0910 D	0,3230 EFG
4	0,3811 BC	NC F	0,3134 FG
5	0,4023 BC	0,0011 EF	0,3147 FG
6	0,4156 BC	NC F	0,3425 EF
7	0,4057 BC	0,3307 A	0,4208 CD
8	0,5342 AB	0,1246 D	0,6490 A
9	0,3996 BC	0,0889 D	0,6491 A
10	0,4467 ABC	0,0788 DE	0,5563 B
11	0,4421 ABC	0,3051 A	0,3106 FG
12	0,4501 ABC	0,2608 AB	0,4580 C
13	0,4891 ABC	0,0856 DE	0,3582 DEF
14	0,3794 BC	0,2985 A	0,2583 G
15	0,7201 A	NC F	0,4572 C
16	0,5368 AB	0,2109 BC	0,3889 CDE

Medias con igual letra en una misma columna son significativamente iguales ($p > 0,05$).

Las concentraciones más altas de 2,4-D que se detectaron están en el suelo, el aire y las aguas superficiales rodeadas de campos de cultivo, lo que sugiere que se deben implementar estrategias de mitigación localmente para evitar la entrada de 2,4-D al medio ambiente (Islam et al., 2018). Podemos indicar entonces que el escaso conocimiento adecuado de los riesgos y manejo adecuado de los plaguicidas por parte de los productores pone en peligro su salubridad, así como la de sus familiares y en general de toda la comunidad debido a intoxicaciones. Por lo tanto, existe la necesidad de implementar iniciativas de educación ambiental y de salud para los agricultores de la región. Sin embargo, en estudios de medición de 2,4-D y sus análogos en 417 muestras de orina recolectadas de 139 niños de 0 a 7 años durante la temporada baja de aplicación de pesticidas gravedad específica urinaria, corregida por SG, en Wuhan (China Central) y Shenzhen (sur de China). La media geométrica (GM) de la concentración urinaria de 2,4-D no conjugado fue de 0,10 $\mu\text{g/l}$ (corregida por orina) (Wenjing et al., 2021). En otros estudios de laboratorio, se indican que la exposición a glifosato y mezclas de 2,4-D, en lugar de exposiciones únicas, puede inducir alteraciones histológicas y transcriptómicas perjudiciales menores en los resultados renales tempranos inducidos por dietas occidentalizadas en ratones machos obesos (Ribeiro, et al., 2023). En el caso de México, el gobierno decretó la prohibición del glifosato a partir de enero de 2024. No obstante, muchos científicos mexicanos coinciden en que el uso de glifosato debería reducirse, pero no prohibirse por completo (Alcántara et al., 2021). Por ende, los métodos

integrados de control de malezas son cada vez más demandados para mantener un alto rendimiento y al mismo tiempo aliviar los efectos ambientales negativos de las medidas de control con agroquímicos (Oveisi et al., 2021). Por lo tanto, se debe entonces mitigar la contaminación por parte del ingrediente activo pulverizado de los pesticidas

que no alcanza el objetivo previsto y contamina los compartimentos medioambientales; esto debe efectuarse mediante nuevos procesos de biorremediación preventiva basado en la aplicación simultánea del pesticida con microorganismos degradantes de pesticidas para reducir el riesgo de lixiviación al medio ambiente (Carles et al., 2021).

CONCLUSIONES

Las parcelas productoras de cacao con concentraciones de residuos de glifosato y 2,4-Diclorofenoxiacético en suelos, hojas y granos fermentados secos de cacao de dieciséis zonas cacaoteras de la región San Martín fueron georreferenciados y detallados en un mapa cartográfico y satelital. Los valores promedios de glifosato encontrados en suelos de parcelas cacaoteras en la región San Martín fueron de 0,5925 ppm como máximo hasta concentraciones de 0,1751 ppm como mínimo, mientras que los valores promedios de 2,4-Diclorofenoxiacético encontrados fueron de 0,7201 ppm como máximo hasta concentraciones de 0,2248 ppm como mínimo. Con respecto a los valores promedios de glifosato encontrados en hojas de cacao cultivadas en parcelas cacaoteras de la región San Martín fueron de 0,2639 ppm como máximo hasta concentraciones mínimas no cuantificables, mientras que los valores promedios de 2,4-Diclorofenoxiacético encontrados fueron de 0,3307 ppm como máximo hasta concentraciones mínimas no cuantificables; sin embargo, las concentraciones

promedias de glifosato encontradas en granos fermentados secos de cacao procedentes de parcelas de la región San Martín, fueron entre 0,0427 ppm y 0,5518 ppm; mientras que para el 2,4-Diclorofenoxiacético, los valores encontrados fueron entre 0,0708 ppm y 0,6491 ppm. Encontrando en el 94% de las muestras (15 parcelas) valores de estos herbicidas por encima de los Límites Máximos de Residuos que establece el Reglamento (UE) 2019/1791 de la Comisión Europea que establece 0,1 ppm para estos analitos. Se recomienda a efectuar análisis a nivel de productos terminados como cacao en polvo, manteca de cacao y chocolates en sus diversas combinaciones y concentraciones de cacao, con la finalidad de determinar si estos compuestos (glifosato y 2,4-D) y otros agroquímicos se encuentran presentes en dichos productos y por ende su cuantificación; todo esto con la finalidad de proteger la inocuidad de los productos y evitar cualquier forma de daño a la salud de los consumidores finales a mediano y a largo plazo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto por el financiamiento a esta investigación en el marco del Concurso de Proyectos de Investigación Científica, Tecnológica e

Innovación a nivel de Docentes Financiados por la UNSM-T período 2020, aprobado mediante Resolución N° 083-2020-UNSM/CU-R.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara-de la Cruz, R., Cruz-Hipólito, H. E., Domínguez-Valenzuela, J. A., & De Prado, R. (2021). Glyphosate ban in Mexico: potential impacts on agriculture and weed management. *Pest Manag Sci*, 77, 3820-3831. <https://doi.org/10.1002/ps.6362>
- Ancayay Leal, V. (2022). Determinación de la presencia del ácido 2,4 diclorofenoxiacético en cacao en grano (*Theobroma cacao*) para exportación. [Tesis de posgrado]. Universidad Estatal de Milagro, Guayas, Ecuador.
- Bataillard, D., Christe, P., & Pigeault, R. (2020). Impact of field-realistic doses of glyphosate and nutritional stress on mosquito life history traits and susceptibility to malaria parasite infection. *Ecol Evol*, 27(10-11), 5079-5088. <https://doi.org/10.1002/ece3.6261>
- Bernal Barreto, E. M. (2020). Implementación de una técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia para detección de glifosato en suelos, lixiviados, tomate (*Solanum lycopersicum*) y albahaca (*Ocimum basilicum*) [Tesis de pregrado]. Universidad Santo Tomás, Colombia.
- Boakye, R. G., Stanley, D. A., & White, B. (2023). Honey contamination from plant protection products approved for cocoa (*Theobroma cacao*) cultivation: A systematic review of existing research and methods. *PLoS ONE*, 18(10), 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280175>
- Brucha, G., Aldas-Vargas, A., Ross, Z., Peng, P., Atashgahi, S., Smidt, H., Langenhoff, A., & Sutton, N. B. (2021). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid degradation in methanogenic mixed cultures obtained from Brazilian Amazonian soil samples. *Biodegradation*, 32(4), 419-433. <https://doi.org/10.1007/s10532-021-09940-3>
- Cano García, A., Ochoa Fuentes, Y. M., Maldonado Ortega, V., Ceballos Ceballos, A. G., Linares Márquez, P., Cerna Chávez, E., & Lafón Terrazas, A. (2022). Determinación y cuantificación de residuos de plaguicidas en suelo y agua en pastizales del noreste de México, hábitat del perrito de la pradera mexicana. *Revista Mexicana De Mastozoología*, 12(1), 33-48. <https://doi.org/10.22201/ie.20074484e.2022.12.1.347>
- Carles, L., Martin-Laurent, F., Devers, M., Spor, A., Rouard, N., Beguet, J., Besse-Hoggan, P., & Batisson, I. (2021). Potential of preventive bioremediation to reduce environmental contamination by pesticides in an agricultural context: A case study with the herbicide 2,4-D. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 125740. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125740>
- Casado, J., Brigden, K., Santillo, D., & Johnston, P. (2019). Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Science of The Total Environment*, 670, 1204-1225. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.207>
- Chávez-Dulanto, P. N., Thiry, A.A.A., Glorio-Paulet, P., Vögler, O., & Carvalho, F. P. (2021). Increasing the impact of science and technology to provide more people with healthier and safer food. *Food and Energy Security*, 10, e259. <https://doi.org/10.1002/fes3.259>

- Delmonico, E., Bertozzi, J., Souza, N., & Oliveira, C. (2014). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC. *Acta Scientiarum Technology*, Volume 36. 513-519. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v36i3.22406>
- Eta, H. C., Eremi, E. O., Idiku, F. O., & Eta, J. N. (2023). Pesticide Use, Management Practices and Perceived Effects on the Health of Cocoa Farmers in Cross River State, Nigeria. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition & Development*, 23(6), 23558–23575. <https://doi.org/10.18697/ajfand.121.22785>
- European Parliament. (2019). Commission Regulation (EU) 2019/1791 amending Annexes II, III and IV to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for 1-decanol, 2,4-D, ABE-IT 56, cyprodinil, dimethenamid, fatty alcohols, florpiauxifen-benzyl, fludioxonil, fluopyram, mepiquat, pendimethalin, picolinafen, pyraflufen-ethyl, pyridaben, S-abcisic acid and trifloxystrobin in certain products. (Text with EEA relevance). Brussels, Belgium.
- Freisthler, M., Robbins, R., Benbrook, C., Young, H., Haas, D., Winchester, P., & Perry, M. (2022). Association between increasing agricultural use of 2,4-D and population biomarkers of exposure: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2014. *Environmental Health*, 21. <https://doi.org/10.1186/s12940-021-00815-x>
- Gaón Sarmiento, E. B. (2013). Efecto y persistencia de glifosato en el cultivo de cacao en Sucumbíos. [Tesis de pregrado]. Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.
- Gandhi, K., Khan, S., Patrikar, M., Markad, A., Kumar, N., Choudhari, A., Sagar, P., & Indurkar, S. (2021). Exposure risk and environmental impacts of glyphosate: Highlights on the toxicity of herbicide co-formulants. *Environmental Challenges*, 4, 100149. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100149>
- González, M., Meza, D., Valentina, Martínez, N. V., & Pedroza, M. R. (2023). Glyphosate impact on human health and the environment: Sustainable alternatives to replace it in Mexico. *Chemosphere*, 340, 139810. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139810>
- Hintze, S., Sameh, Y., Hannalla, B., Guinchard, S., Hunkeler, D., & Glauser, G. (2021). Determination of chlorothalonil metabolites in soil and water samples. *Journal of Chromatography A*, 1655, 462507. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462507>
- Hisyam Zainudin, B., Salleh, S., Syukur Yaakob, A. y Mohamed, R. (2021). Comprehensive strategy for pesticide residue analysis in cocoa beans through qualitative and quantitative approach. *Food Chemistry*, 368, 130778. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130778>
- Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Khan, M. S., Xu, L., Zhu, J., Zhao, M., Muños, S., Li, Q.X. y Zhou, W. (2018). Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ Int*, 111, 332-351. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.020>
- Martínez-Ruiz, E. B., & Martínez-Jerónimo, F. (2018). Exposure to the herbicide 2,4-D produces different toxic effects in two different phytoplankters: A green microalga (*Ankistrodesmus falcatus*) and a toxigenic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). *Science of the total environment*. 619–620, 1566–1578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.145>
- Mohamed, R., Hisyam Zainudin, B. y Syukur Yaakob, A. (2020). Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 303, 125392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125392>
- MIDAGRI - Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2020). *Observatorio de Commodities: Cacao*. Dirección General de Políticas Agrarias. DEEIA. Lima, Perú.
- MINSA-Ministerio de Salud. (2016). Resolución Ministerial N° 1006-2016/MINSA que aprueba la NTS N° 128-2016/MINSA/DIGESA "Norma Sanitaria que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) de plaguicidas de uso agrícola en alimentos de consumo humano". Lima, Perú.
- Oveisi, M., Pourmorad Kaleibar, B., Rahimian Mashhadi, H., Müller-Schärer, H., Bagheri, A., Amani, M., Elahinejad, M., & Masoumi, D. (2021). Bean cultivar mixture allows reduced herbicide dose while maintaining high yield: A step towards more eco-friendly weed management. *European Journal of Agronomy*, 122, 126173. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126173>
- Ouyang, Y., Chen, D., Fu, Y., Shi, W., Provin, T., Han, A., Van Shaik, E., Samuel, J. E., De Figueiredo, P., Zhou, A., & Zhou, J. (2021). Direct cell extraction from fresh and stored soil samples: Impact on microbial viability and community compositions. *Soil Biology and Biochemistry*, 155, 108178. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108178>
- Rangel González, P. E. (2017). *Determinación de herbicidas en las matrices ambientales: suelo y agua, en Papanla, Veracruz*. Tesis de posgrado. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Ribeiro, G., Luri, de Souza, J., Cardoso, L., & Barbisan, L. F. (2023). Assessment of the impact of glyphosate and 2,4-D herbicides on the kidney injury and transcriptome changes in obese mice fed a Western diet. *Toxicology Letters*, 385, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.08.003>
- Sesin, V., Davy, C. M., Stevens, K. J., et al. (2020). Glyphosate Toxicity to Native Nontarget Macrophytes Following Three Different Routes of Incidental Exposure. *Integr Environ Assess Manag*. 17(3), 597-613. <https://doi.org/10.1002/ieam.4350>
- Villanueva, E., Glorio-Paulet, P., Giusti, M. M., et al. (2023). Screening for pesticide residues in cocoa (*Theobroma cacao* L.) by portable infrared spectroscopy. *Talanta*, 257, 124386. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124386>
- Viteri Salazar, O., Latorre, S., Zambrano Godoy, M., & Quelal-Vásquez, M. A. (2023). The challenges of a sustainable cocoa value chain: A study of traditional and "fine or flavour" cocoa produced by the kichwas in the Ecuadorian Amazon region. *Journal of Rural Studies*, 98, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2023.01.015>
- Wenjing Song, Yanjian Wan, Ying Jiang, Zhengdan Liu, & Qi Wang. (2021). Urinary concentrations of 2,4-D in repeated samples from 0–7 years old healthy children in central and south China. *Chemosphere*, 267, 129225. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129225>
- Zhen, J., Shu-Shen, L., Ya-Qian, X. y Kai, L. (2019). Combined Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Its Metabolites 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP) on Two Nontarget Organisms. *ACS Omega*, 4, 1669–1677. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02282>