



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y FÚNGICA DE GRANOS
DE CACAO (*theobroma cacao* L.). SU POTENCIAL
MICOTOXIGÉNICO Y SU CONTROL MEDIANTE EL USO DEL
ACEITE ESENCIAL DE TIMOL.**

DIRIGIDO POR:

Dra. **LEYMAYA GUEVARA**

Dr. **CLÍMACO ÁLVAREZ**

TABAJO ESPECIAL DE GRADO
PRESENTADO ANTE LA ILUSTRE
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
POR EL Br. **YRVIN LEÓN** PARA OPTAR AL
TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CARACAS-VENEZUELA
2012

*A mis Padres. Verdaderos
ejemplos de Amor en mi vida*

AGRADECIMIENTOS

- Doy gracias al Dios de la Vida por colmarme de su Espíritu para afrontar los retos que diariamente se me presentan. Sin duda alguna, las ciencias me acercaron más a ti y me mostraron tu verdadera grandeza y belleza inagotable.
- Gracias infinitas a mis padres. Quienes me apoyaron en todo momento tanto monetaria como espiritualmente. Gracias mamá. Te amo con todo mi corazón. También te amo a ti papá. Eres símbolo de la perseverancia y de hombre verdadero al superar todas las trabas que la vida te colocó en el camino.
- Gracias a mis tres hermanas. Siempre se calaban mis discursos de ciencia en la casa. Saben que las quiero mucho y me tienen en todo momento.
- Gracias a mi abuela, la cual desde su cama me brindó de su hermosura tantas noches de desvelo.
- Gracias a mis amigas Kenya y Julieta. Son muy importante para mí. Su presencia en mi carrera fue una verdadera bendición y lo saben. Las quiero un montón.
- Gracias a mis amigos Julio, Isamar, Helen, padre Oscar, Grect. Son una refrescante brisa para mi alma.
- Gracias a Miriam y a Yadira. Son la música de mi carrera. Valiosas personas.
- Gracias a mi País por darme la oportunidad de estudiar. Especialmente a las labores del Presidente Chávez las cuales me facilitaron muchísimas cosas. De mi un hombre entregado para devolver a la nación lo que me brinda diariamente.
- Gracias a la Universidad Central de Venezuela por abrirme sus puertas y confiar en mí. Especialmente gracias a todos los profesores entregados a su carrera que formaron mi espíritu científico.
- Gracias a mi tutora Leymaya por dirigir mi trabajo y brindarme parte de su experiencia como bióloga.
- Gracias Clímaco por tu valiosa ayuda. Eres un gran amigo y un científico de admirar.
- Gracias al profesor Amauri y Elevina por su guía en todo este trabajo.
- Gracias al INIA, ICTA, SENIAT y a la empresa Cacao ODERI por abrir sus laboratorios para la realización de los experimentos.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	iii
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. EL CACAO (Theobroma cacao L)	5
1.1 CACAO CRIOLLO.....	8
1.2 CACAO FORASTERO	8
1.3 CACAO TRINITARIO.....	9
1.4 MEDIO AMBIENTE Y CACAO	9
1.5 BENEFICIO DEL CACAO	10
2. MOHOS.....	17
2.1 CLASIFICACIÓN	18
2.2 CONDICIONES NUTRICIONALES DE LOS MOHOS.....	19
2.3 MOHOS Y ALIMENTOS.....	20
2.4 LOS MOHOS Y SU IMPORTANCIA EN GRANOS DE CACAO	22
2.5 DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS GENEROS DE MOHOS PRESENTES EN CACAO	22
3. MICOTOXINAS Y SALUD PÚBLICA	24
3.1 AFLATOXINAS	27
3.2 CITRININA	28
3.3 PATULINA	28
3.4 OCRATOXINAS	28

4.	ACEITES ESENCIALES PROVENIENTES DE PLANTAS	29
4.1	ACEITES ESENCIALES Y ALIMENTOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS		39
1.	MATERIA PRIMA	39
1.1.	EL BENEFICIO Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	40
1.2.	TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	41
1.3.	PRUEBA DE CORTE DE CALIDAD EN LOS GRANOS DE CACAO	42
2.	ANÁLISIS PROXIMAL DE LOS GRANOS DE CACAO.	43
3.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS GRANOS DE CACAO	43
4.	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	44
4.1.	RECUENTO DE MOHOS TOTALES E IDENTIFICACIÓN	44
4.2.	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE INFESTACIÓN	45
4.3.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD TOXIGÉNICA DE LAS CEPAS FÚNGICAS AISLADAS.....	45
5.	EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE TIMOL SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA FLORA FÚNGICA PRESENTE EN LOS GRANOS DE CACAO.....	46
5.1.	MEDIO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	46
5.2.	PREPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL (AE) DE TIMOL.....	47
5.3.	EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL TIMOL SOBRE EL DESARROLLO DE LOS MOHOS EN MEDIO SÓLIDO.....	47
5.4.	EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL TIMOL SOBRE EL DESARROLLO DE LOS MOHOS PRESENTES EN GRANOS DE CACAO FERMENTADOS, SECADOS AL SOL Y ALMACENADOS POR 25 DÍAS.....	48
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	48
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....		50

1.	PRUEBA DE CORTE.....	50
1.1	EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LOS GRANOS DE CACAO CON TESTA.....	53
1.2	CONTENIDO DE HUMEDAD	54
1.3	CENIZA.....	55
1.4	PROTEÍNA CRUDA.....	56
1.5	GRASA CRUDA	58
1.6	FIBRA Y OTROS CARBOHIDRATOS	59
2.	ANÁLISIS FISICOQUÍMICO.....	60
2.1	pH Y ACIDÉZ TITULABLE.....	60
3.	ANALISIS MICROBIOLÓGICO.....	62
3.1	RECuento DE MOHOS TOTALES.....	62
3.2	Muestra del INIA lote I. Contaje de mohos en la testa (cascarilla), grano entero y endospermo.	62
3.3	Recuento de mohos totales en granos de cacao beneficiados y almacenados por el INIA, Empresa y un Productor independiente.	64
3.4	PRINCIPALES ESPECIES DE MOHOS AISLADOS DE LOS GRANOS DE CACAO ANALIZADOS.....	69
3.5	PORCENTAJE DE INFESTACIÓN DE LOS MOHOS EN LOS GRANOS DE CACAO EVALUADOS.....	80
4.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD TOXIGÉNICA DE LAS VARIEDADES DE MOHOS AISLADAS.....	82
5.	EVALUCIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DEL TIMOL.....	84
5.1	EN AGAR EMA SOBRE LAS SIETE CEPAS AISLADAS.	85

5.2	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL TIMOL, ROCIADO POR ASPERSIÓN, SOBRE LOS MOHOS PRESENTES EN LOS GRANOS DE CACAO FERMENTADO, SECADOS AL SOL Y ALMACENADOS POR DOS MESES POR UN PRODUCTOR	87
	A LOS SEIS DÍAS DE ALMACENAMIENTO.....	87
	A LOS VEINTICINCO DÍAS DE ALMACENAMIENTO	91
	CONCLUSIONES.....	100
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de corte de calidad (COVENIN N° 50, 1995)	51
Tabla 2. Composición química proximal (% base seca) de los granos de cacao fermentados-secos (con testa) y con distintos almacenamientos.	54
Tabla 3. pH y acidez total titulable de las muestras de grano de cacao fermentadas y secadas al sol.....	61
Tabla 4. Niveles de mohos en el grano entero, testa y endospermo de las muestras del primer lote del INIA.....	63
Tabla 5. Niveles de mohos encontrados en granos de cacao almacenados en el INIA, Empresa y Productor independiente.	68
Tabla 6. Principales especies de mohos aislados de muestras de testa de granos de cacao, provenientes del lote I INIA (Moho total y % colonización).	70
Tabla 7. Principales especies de mohos aislados de muestras de granos de cacao, provenientes y almacenados del lote II INIA (Moho total y % colonización).	72
Tabla 8. Principales especies de mohos aislados de muestras del lote II INIA y almacenados en una empresa (Moho total y % colonización)	74
Tabla 9. Principales especies de mohos aislados de muestras beneficiadas y almacenadas por un Productor independiente-Miranda (Moho total y % colonización).	76
Tabla 10. Niveles de mohos a los 6 días de almacenamiento con las distintas concentraciones de timol en granos de cacao.....	88
Tabla 11. Principales especies aisladas de mohos después de los seis días de almacenamiento con el tratamiento por aspersión con timol.	89
Tabla 12. Niveles de mohos a los 25 días de almacenamiento con las distintas concentraciones de timol en granos de cacao.....	91
Tabla 13. Principales especies aisladas de mohos después de los 25 días de almacenamiento con el tratamiento por aspersión con timol.	93
Tabla 14. Porcentaje fungicida de los mohos aspergidos por timol para un almacenamiento de 6 y 25 días.	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte de la mazorca de cacao con un machete	12
Figura 2. Cacao en fermentación en cajones de madera cubiertos con hojas de musáceas. 14	
Figura 3. Granos de cacao fermentados secándose al sol sobre piso de cemento.	15
Figura 4. Granos de cacao después de haber sido cortados en la guillotina en la realización de la prueba de corte de calidad	53
Figura 5. Niveles de mohos en el grano entero, testa y endospermo del cacao del Lote I INIA.	64
Figura 6. Niveles de mohos en granos beneficiados y almacenados por distintas fuentes. ..	69
Figura 7. Principales especies de mohos aislados de muestras de testa de granos de cacao del Lote I INIA (Moho total y % colonización).....	70
Figura 8. <i>Aspergillus penicillioide</i> visto al microscopio	71
Figura 9. Principales especies mohos aislados de muestras de granos de cacao del Lote II INIA (Moho total y % colonización).....	72
Figura 10. <i>Penicillium citrinum</i> visto al microscopio.....	73
Figura 11. Principales especies de mohos aislados de muestras del lote II INIA y almacenados en una empresa (Moho total y % colonización).	74
Figura 12. <i>Absidia corymbifera</i> vista al microscopio.....	75
Figura 13. Principales especies de mohos aislados de muestras beneficiadas y almacenadas por un productor independiente-Miranda (Moho total y % colonización).	76
Figura 14. <i>Aspergillus fumigatus</i> visto al microscopio.....	79
Figura 15. Granos de cacao infestados por mohos.....	82
Figura 16. Principales especies de mohos aislados de muestras almacenadas por un Productor y realmacenadas con tratamiento con timol por seis días (Moho total y % colonización).	90
Figura 17. Placas de agar DRBC mostrando el conteo de mohos realizado a los granos de cacao después de 25 días de haber aplicado el tratamiento con timol y el control.	92

Figura 18. Principales especies de mohos aislados de muestras almacenadas por un Productor y realmacenadas con tratamiento con timol por 30 días (Moho total y % colonización). 94

Figura 19. Comparación del efecto del timol a los 6 y 25 días de almacenamiento del grano de cacao 96

RESUMEN

El siguiente trabajo tuvo como objetivo principal la Determinación de la microbiota, su potencial micotoxigénico y la caracterización fisicoquímica en granos de cacao beneficiados y secados al sol por distintos proveedores del estado Miranda (INIA, productor y una empresa) y su control mediante el uso del aceite esencial de timol. El análisis microbiológico indicó un conteo total de mohos para las muestras tratadas, siendo el mayor las del productor ($5,24 \log_{10}$ UFC/g), seguida por las del INIA I ($4,87 \log_{10}$ UFC/g) almacenadas por cinco meses, y las muestras de la empresa y del INIA II que presentaron un recuento de $3,76 \log_{10}$ UFC/g y $2,33 \log_{10}$ UFC/g respectivamente. De manera general se aislaron una totalidad de siete especies en las muestras de granos de cacao beneficiadas y almacenadas por todos los proveedores. Siendo estas *Rhizopus sp*, *Cladosporium pshaerospermum*, *Geotricum candidum*, *Absidia corymbifera*, *Penicillium citrinium*, *Aspergillus penicillioide* y *Aspergillus fumigatus*. La especie *Rhizopus sp* fue la más abundante en todas las muestras, con excepción de las muestras almacenadas en el INIA en su segundo lote, quienes presentaron los niveles de moho total más bajos. De las siete especies de mohos aisladas en todas las muestras, tres especies difieren con el tipo de almacenamiento, estas son *A. fumigatus*, *Absidia corymbifera* y *A. penicillioide*. Por otra parte, la evaluación en cromatografía de capa fina indicó que las siete cepas de las especies de mohos aisladas y evaluadas no mostraron capacidad toxinogénicas en agar EMA. En cuanto a la evaluación antifúngica de diferentes concentraciones de

timol tanto en agar EMA como en aspersión sobre los granos se mostró: total inhibición del crecimiento radial de las siete especies aisladas en agar EMA tratadas con diferentes concentraciones del aceite esencial de timol (500, 1000 y 5000 ppm), durante los 30 días de tratamiento. Mientras que el tratamiento por aspersión con timol sobre los granos de cacao beneficiados y almacenados por un productor, arrojaron una reducción de alrededor $2 \log_{10}$ FCU/g, con todas las concentraciones de timol aplicadas (250, 500 y 1000 ppm).

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L) del griego Theos Dios y broma Alimento (alimento de los dioses), es una planta de origen americano que apareció hace aproximadamente 4000 años. Debido al sistema nómada que siempre llevaron los habitantes de este continente, es prácticamente imposible decir a ciencia cierta el origen de esta fruta. Por su parte, la elaboración del cacao parte de un proceso fermentativo y de secado en el cual un conjunto de microorganismos interfieren sinérgicamente con la genética de la planta, para dar aparición a las características organolépticas del cacao (Thompson y col., 2001).

No obstante, muchas veces en el proceso de elaboración los granos de cacao pueden contaminarse con mohos que, en ocasiones, producen unas toxinas llamadas micotoxinas (Sánchez y col., 2008). La contaminación por micotoxinas es una causa importante de pérdidas económicas en el sector del cacao. Además, estas pueden causar daños severos a la población ya que pueden favorecer la aparición de muchas enfermedades tales como: cáncer, dermatitis, daños a nivel de los riñones, etc. (Bogantes y col., 2004). Se estima que una cuarta parte de toda la producción de cacao está contaminada. La detección temprana es vital antes de que el cacao se procese en una gama de productos alimenticios. En fin, todo esto conlleva a la búsqueda de métodos y sustancias que de alguna manera inhiban el desarrollo de tales mohos y sus aflatoxinas.

Una de las técnicas utilizadas para inhibir el crecimiento de microorganismos deteriorativos o patógenos de alimentos, es el uso de agentes químicos con actividad antimicrobiana. Estos agentes químicos pueden ser de dos tipos: compuestos sintéticos (sorbatos, benzoatos y sulfitos) o sustancias derivadas de la actividad biológica que en su conjunto son llamados antimicrobianos naturales. Dentro de la clasificación de antimicrobianos de incidencia natural y con posible aplicación en otros alimentos se encuentran los provenientes de plantas. Estos antimicrobianos son metabolitos secundarios que la planta produce para protegerse del ataque de diversos microorganismos patógenos. Entre los metabolitos secundarios importantes relacionados con los mecanismos de defensa, destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999. Citado por: Borboa-Flores y col., 2010). Algunos sistemas antimicrobianos naturales utilizados para inhibir el crecimiento microbiano son el timol, el carvacrol, el eugenol, entre otros. Estos compuestos han sido identificados como efectivos contra el crecimiento microbiano debido a que son compuestos fenólicos (Aballa y Rosen, 2001). Diversos estudios indican que los compuestos de los aceites esenciales interfieren con las funciones de permeabilidad de la membrana celular, (Burt, 2004).

El presente trabajo tiene como finalidad, evaluar la incidencia, la flora fúngica y sus micotoxinas en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) y su posible control con el aceite esencial de timol.

OBJETIVOS

General

Determinar la micobiota, su potencial micotoxigénico y la composición físico-química en granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) fermentados, secos y cosechados en Barlovento, Edo. Miranda; su control mediante el uso del aceite esencial de timol.

Específicos

- Comparar mediante la prueba de corte de calidad las características físicas de los granos de cacao fermentados, secos y cosechados en Barlovento, Edo. Miranda.
- Determinar la composición química proximal de los granos de cacao fermentados, secos y cosechados en Barlovento, Edo. Miranda.
- Determinar la flora fúngica y grado de infestación en muestras de granos de cacao seco (fermentados, secos y cosechados en Barlovento, Edo. Miranda).
- Identificación mediante clave taxonómica de los principales mohos contaminantes y colonizantes del cacao seco.
- Evaluar la formación de micotoxinas mediante un método de screening (en cromatografía de placa fina).
- Evaluar el efecto inhibitorio del aceite esencial de timol en la flora fúngica

aislada del cacao y sobre el cacao.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. EL CACAO (*Theobroma cacao* L)

Los pioneros en establecer plantaciones de cacao fueron los mayas específicamente en la península de Yucatán. Estaban tan relacionados con el cacao que lo metieron profundamente en su economía utilizando las semillas como moneda y medida.

Los europeos tuvieron su primera experiencia con el cacao sino hasta el cuarto viaje de Colón a América en 1502.

El cacao en Venezuela fue encontrado en forma silvestre durante la conquista. Los primeros cultivos en el país fueron desarrollados en Maracaibo en los alrededores del extremo meridional del Lago de Maracaibo y en la Cordillera Andina (Salazar y Guaita, 1985). Las plantaciones de cacao comienzan a desarrollarse a través de la mano de los Misioneros Franciscanos en el Estado Miranda, siendo las semillas importadas desde Nicoya en Costa Rica o de Cuba (Pettier, 1935). Venezuela se sitúa a mediados del siglo XIX como el mayor exportador mundial de cacao. Estado que no se mantiene actualmente.

Existen diversas especies de cacao entre ellas se encuentran el *Theobroma cacao* L, el cual es originario de América del sur en los países de Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Siendo este último país el poseedor de la mayor variabilidad de especie

(Pound, 1933). Por ende la ubicación en dichos países tropicales trae consigo un alza en la contaminación del cacao por los mohos, contribuyendo así con el deterioro del mismo y afectando su producción (Magan y Aldred, 2005). También la calidad se ve afectada por el genotipo, el tipo de suelo en el cual se cultiva, la tecnología utilizada en la post-cosecha así como la manipulación ofrecida (Reyes y De Reyes, 2001).

Por otro lado Ramos y col., (1993) afirman que existen dos grandes grupos de cacao denominados criollos y amazónicos, correspondiendo como sitio de origen el norte de los Andes Colombianos, Centro América y México al cacao criollo y más hacia el Sur para el cacao amazónico, específicamente en las cordilleras andinas incluyendo Bolivia y Perú así como también las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco en Venezuela.

El *Theobroma cacao* L. es un organismo diploide con 20 pares de cromosomas (Cuatrecasas, 1964 citado por El Khori, 2006). La clasificación Taxonómica del cacao según Molina (1989) es la siguiente:

Reino: Plantae, **División:** Spermatophyta, **Clase:** Angiospermae, **Sub-clase:** Dicotyledoneae, **Orden:** Malvales, **Sub-orden:** Malvinae, **Familia:** Sterculiaceae, **Tribu:** Byttnerieae, **Género:** Theobroma, **Especie:** *Theobroma cacao* L.

Morfológicamente el fruto del cacao corresponde al de una drupa la cual se sostiene de un pedúnculo leñoso que nace del pedicelo floral y pueden ser de forma

redondeada, alargados y ovoides pudiéndose presentar o no en su superficie los denominados surcos. Se han podido observar como partes del fruto el epicarpio, mesocarpio y endocarpio. Siendo el primero constituido por tejido epidérmico con compuestos antociánicos, el segundo el cual es carnosos; está formado por el parénquima y por último el endocarpio de consistencia leñosa. El rango del tamaño de la mazorca está comprendido entre 10 y 32 cm de largo (Braudeau, 1970).

Vidal, (1999) describe al fruto como pequeño con 5 carpelos que contienen las semillas, tales cavidades van desapareciendo al madurar el fruto, para formar una sola cavidad con una columna central denominada yuyo, en el cual se soportan 5 paquetes de granos. También, comenta el autor que el período de tiempo necesario para la formación del fruto desde la fecundación hasta la maduración, está comprendido entre los 5 y 7 meses, lo cual varía según la genética de la planta y las condiciones ambientales operantes en el sitio.

La semilla o también denominada almendra, corresponde a la parte más aprovechada del fruto. Esta está arropada por una pulpa denominada mucílago la cual es azucarada y ácida. Las almendras están ligadas a la placenta. La semilla posee una testa gruesa de cutícula dura. Debajo de esta cutícula se hallan los cotiledones (dos), cuyo propósito es proteger y nutrir al embrión. Los cotiledones están compuestos por grasas, taninos, alcaloides que al ser sometidos al proceso fermentativo proporcionan el olor y sabor característico del chocolate (Vidal, 1999). La semilla del **Theobroma**

cacao L. es muy rica en grasas (Bekele y Bekele, 1996).

Según la comercialización existen tres tipos de cacao; el criollo, el trinitario y forastero Enríquez, (1985). Siendo el Forastero el poseedor del 90 % de la producción mundial de cacao.

1.1 CACAO CRIOLLO

Comprenden a los cacaos que guardan las características de los antiguos cacaos Criollos venezolanos, principalmente el poseer los cotiledones de color blanco o crema (Bradeau, 1975). El caco extrafino proviene de los árboles del criollo (Wood y Lass, 1985). Puede fermentar en tres días. Pertenece a la subespecie *Theobroma cacao* los cuales incluyen a los Criollos Andinos, Criollos Porcelana y los de la costa del estado Aragua (Chua, trinitarios finos, Ocumare y Cuyagua) (Reyes y De Reyes, 2000)

Los cacaos criollos son más susceptibles frente a enfermedades producidas por hongos y virus en comparación con los cacaos Forasteros.

1.2 CACAO FORASTERO

Su origen radica en el alto Amazonas y se distingue por sus granos frescos más o menos aplastado, siendo las almendras poseedoras de cotiledones de color purpura intenso, aroma débil o poco pronunciado, sabor amargo y una durabilidad en la fermentación de 5 a 7 días. El cacao Forastero puede soportar fuertes cambios de

clima, pudiéndose adaptar a diferentes ambientes. Este cacao es bajo en su contenido en grasa. Gumán (2007) señala que el Forastero constituye la mayoría de los cacaos corrientes plantados en Brasil, África Occidental, Malasia e Indonesia, ubicándolos en un 70 % de la producción mundial. Sin embargo son de baja calidad.

1.3 CACAO TRINITARIO

Esta variedad la comprendes los diferentes híbridos de cacao en Trinidad y Venezuela cuyo origen es el cruce entre el cacao Forastero Amazónico y Criollo. El cacao Trinitario ha desplazado grandemente al Criollo. Cabe destacar que el sabor y aroma se encuentra influenciado por el material genético, la variación en la composición de polifenoles antes y después del tratamiento post-cosecha (Clapperton, 1994). Es utilizado ampliamente por la industria dando lugar a chocolates muy aromáticos con un agudo sabor a cacao y el color de sus cotiledones es de morado claro (Guzmán, 2007).

Están ubicados en Aragua, Miranda y Sucre y representan casi el 90 % de la producción del país (Guzmán, 2007).

1.4 MEDIO AMBIENTE Y CACAO

Las lluvias tienen gran influencia en el desarrollo del cacao, pues las que se desarrollan en épocas secas son más pequeñas que aquellas desarrolladas en épocas de lluvia. Por otro lado la temperatura influye sobre la composición química de la grasa de cacao, reflejándose los cambios en la textura de la grasa. Investigaciones

desarrolladas en Brasil indican que semillas de cacao desarrolladas en meses fríos poseen en la constitución de su grasa una mayor proporción de ácidos grasos insaturados confiriendo suavidad y menor firmeza (Liendo y col., 1997). La catálisis enzimática que da origen a la grasa puede ser influenciada por la temperatura. Las temperaturas elevadas bajo condiciones controladas durante el desarrollo del fruto del cacao, indicaron que los ácidos grasos eran en su mayoría saturados y en bajo porcentaje los insaturados (Liendo y col., 1997). En las sequías el grano de cacao es menos grasos.

El estado del clima en el área de cosecha determinará el tipo de secado a aplicar y la eficiencia del proceso pudiendo esto tener significancia en el grano almacenado (Liendo y col., 1997).

1.5 BENEFICIO DEL CACAO

El beneficio del cacao posee como fin según Enríquez (1985) los siguientes puntos:

- La descomposición y remoción del mucílago azucarado que cubre al grano, lo cual facilitará el secado, almacenamiento y conservación del producto.
- La elevación de la temperatura hasta la muerte del embrión para abrir paso al desarrollo del sabor a chocolate.
- Mejorar el sabor y aroma de las almendras.
- Facilitar el desprendimiento de la testa del grano.

- Desarrollar un color que aumente la atracción para el mercado.

En la elaboración del chocolate intervienen muchos procesos, desde lo que es el momento indicado de la recolección de los frutos maduros y sanos (cosecha), el picado del fruto de la mazorca llamado desgranado, en el cual se desprenden los granos de la mazorca abierta y se someten al proceso fermentativo hasta el secado del grano (Braudeau, 1970). El Khori, (2006) señala que el desgranado debe realizarse sin separar el fruto de la planta madre. Esto es llevado a cabo por un machete que rompe la mazorca seguido de la extracción del grano por los dedos o con una paleta. Reyes y De Reyes, (2000) explican que cuando la apertura de la mazorca es llevada a cabo con la paleta se evita posibles fisuras en las semillas causadas por utilizar el machete, por lo cual se evita el ataque de hongos y de insectos. Guzmán (2007) indica que no se debe esperar mucho tiempo en la recolección de las mazorcas maduras, pues existen riesgos de podredumbre y germinación. Las almendras germinadas poseerán orificios producidas en la manipulación del grano al desprender la radícula, haciéndose posible el ataque hongos e insectos que destruirán la almendra. La recolección no debe realizarse antes de la madurez, pues esto afecta la fermentación, ya que las almendras provenientes de mazorcas verdes no fermentan, y por lo tanto se da lugar a un porcentaje elevado de almendras violetas, apizarradas y mohosas. Guzmán (2007), indica que las almendras provenientes de mazorcas enfermas de color negro (debido al ataque de hongos) deben ser eliminadas ya que ocasionaran problemas durante la fermentación, lo que se refleja en un mal aroma y sabor después

del beneficio.



Figura 1. Corte de la mazorca de cacao con un machete

La fermentación es un proceso microbiológico de primordial importancia, ya que es en ella donde se desarrolla las características de sabor y aroma. Una de las cosas que sucede es la eliminación o degradación del mucílago, permitiendo con esto una entrada de oxígeno hacia la semilla y aumento en el secado y producción de ácido acético en conjunto con bacterias, generando la inhibición de la germinación (López y col, 1995). El mucílago es descompuesto por las bacterias ácido lácticas y principalmente por levaduras. La fermentación se divide en dos etapas; la hidrolítica o anaeróbica y la oxidativa (Enríquez, (1985) citado por El Khori (2006)). Este investigador indica, que la primera etapa sucede a pH de 3,4-4,0, con un porcentaje

de azúcar entre 8-24, y que tales parámetros inducen el crecimiento de levaduras anaeróbicas (*Sacharommyces*) las cuales formaran alcoholes. En esta etapa sucede la hidrólisis de proteínas en aminoácidos y péptidos. Además, este primer proceso trae consigo la eliminación del mucílago y por ende la entrada de oxígeno, pasando por ende a la fase 2 u oxidativa, la cual favorecerá el crecimiento de bacterias ácido lácticas tales como *Acetomonas* y *Azotobacter* siendo estas las causantes de la producción de ácido acético debido a la oxidación del alcohol. En este proceso los mohos filamentosos tienen un papel importante ya que durante los primeros días de la fermentación, estos forman la poligalacturonidasa cuya actividad radica en la degradación de la pulpa. (Made y Graham, (2003) citado por El Khorri (2006)). La fase aeróbica acarrea la condensación química de los compuestos polifenólicos en productos insolubles que poseen poco o nulo sabor. La oxidación de los polifenoles continúa en la etapa de secado hasta que la actividad enzimática es detenida por el descenso de la humedad.

Thompson y col. (2007) indican, que cambios durante la fermentación a la elevación de la temperatura (25 °C antes y 50 °C durante), ocasionan un aumento de ácidos orgánicos y la concomitante disminución del pH, siendo estos factores influyentes en la bioquímica dentro del grano de cacao, teniendo una fuerte influencia en la calidad y flavor del cacao. Este autor comenta que durante la fermentación el contenido de humedad dentro de los cotiledones es mayor del 35%, la cual es importante para que las enzimas y sustratos que participan en la fermentación tengan

una buena migración. En cuanto a los cambios referentes al pH, indica que antes de la fermentación es alrededor de 6.5 y que se ve disminuido hasta 4.5 al finalizar ésta. La actividad enzimática resulta en el aumento de aminoácidos libres y disminución del contenido de azúcares tales como la glucosa y fructosa desde un 2% al inicio de la fermentación hasta cerca del 0% al final tal proceso.

Guzmán (2007), señala a los responsables del color purpura de las almendras (3-β-D galactosidilcianidina y 3-α-L arabinocidicianidina) e indica que estos pigmentos son hidrolizados a azúcares y cianidina durante la fermentación. Concluye que a pesar de que los pigmentos no son responsables del aroma desarrollado en el cacao, existe una relación inversa entre el desarrollo del sabor y el color purpura retenido.



Figura 2. Cacao en fermentación en cajones de madera cubiertos con hojas de musáceas.

Luego de la fermentación se hace paso al secado en el cual el contenido de humedad se reduce hasta un 7 y 8%, lo cual facilita el almacenamiento, manejo y comercialización del cacao (Cros y Jeanjean, 1995). Este proceso es de suma importancia ya que si el secado es excesivo se puede reducir a tal punto la humedad que los granos se quebrarían, por tanto las plagas de diversa índole atacarían al grano. Por otro lado si el secado es incompleto el exceso de humedad promovería el crecimiento de hongos que deterioran la calidad (Jinap y col, 1994). Guzmán (2007), indica que el fin primordial del proceso de secado es completar el proceso oxidativo iniciado en la fermentación, lo traerá una reducción de la astringencia, amargor y acidez de la almendra.



Figura 3. Granos de cacao fermentados secándose al sol sobre piso de cemento.

En Venezuela se utiliza en la elaboración del chocolate muchos métodos de fermentación entre los cuales se tiene el llamado cajón de madera, el apilado del cacao etc. Este último consiste en agrupar el cacao que contiene el mucílago después del desgrane y cubrirlo con hojas de musáceas, dejándose reposar en ellas por un lapso de dos días, tiempo en el cual se pierde parte del líquido del cacao. Seguido de esto se extiende en sitios denominados patios de secados. En ellos se deja reposar los granos los cuales sufren una deshidratación y pierden el resto de la humedad (El Khori, 2006). En Barlovento en el estado Miranda, l mayoría de los productores fermentan de distintas maneras pequeñas cantidades de granos de cacao. Dicha práctica depende de la experiencia que tiene el productor y del conocimiento que tiene en el manejo postcosecha del cacao (Álvarez y col., 2010).

Cabe señalar que durante la fermentación, secado y tostado, los granos del cacao desarrollan los precursores del aroma y sabor a chocolate. El procesamiento de los granos de cacao después de estos procesos comprende la limpieza y selección de los granos; el tostado a nivel industrial o artesanal; descascarillado; molienda de la almendra sin cáscara; el refinado para la obtención del licor de cacao, prensado del licor para producir manteca de cacao y torta de cacao; y finalmente molienda de la torta para el producto final llamado polvo de cacao (Minifie, 1989; Kealey y col, 2005).

Durante el tostado se producen compuestos como pirazinas y pirroles. Las proteínas hidrolizadas en la fermentación poseen aminoácido que en el tostado

interactuara con los azúcares a través de la reacción de Maillard. Lo cual dará como resultado que el aroma del cacao en la combinación de muchos compuestos (Voigt, 1995).

2. MOHOS

Los hongos son organismos eucariontes quimioheterótrofos, necesitando por lo tanto compuestos orgánicos como fuente de energía y carbono. Son aerobios o anaerobios facultativo. Se conocen pocos anaerobios. Los hongos se dividen en mohos y levaduras. Las levaduras se identifican en base a pruebas bioquímicas, mientras que los mohos en base a sus macro y microscópicas. Los mohos poseen un tallo formado por filamentos largos (llamados hifas) de células unidas. Las hifas de casi todos los mohos están tabicadas y dividen el filamento en unidades separadas similares a una célula mononucleada. Los mohos que no están tabicados poseen en las hifas células continuas y largas con muchos núcleos llamadas cenocíticas. Una hifa o un fragmento de esta pueden dar origen a un nuevo organismo. La porción del moho destinada a la obtención de nutrientes se denomina hifa vegetativa; mientras que la porción que participa en la reproducción se denomina hifa reproductiva o aérea. Al conjunto de hifas desarrolladas se les denomina micelio (Tortora, 2007).

Los mohos pueden reproducirse de manera asexual por fragmentación de las hifas y producción de spora de manera sexual y asexual. Las esporas asexuales se

forman a partir de hifas de un organismo. La germinación de estas esporas trae consigo el desarrollo de un organismo genéticamente idéntico al parental. Por su parte, las esporas asexuales se producen por la fusión de los núcleos de dos cepas de sexo opuesto de la misma especie, teniendo por lo tanto el organismo formado características genéticas de ambas cepas parentales. Las esporas tienen gran importancia en la identificación de los mohos (Tortora, 2007).

Las esporas asexuales son producidas mediante la mitosis y posterior división celular. Se conocen dos tipos de estas esporas, las cuales son las conidiosporas o conidios (espora multicelular o unicelular no encerrada en un saco) y las esporangiosporas (formadas dentro de un saco). Por otro lado una espora sexual es el resultado de la reproducción sexual en tres etapas. La primera corresponde a la plasmogamia, en la cual un núcleo haploide de una célula donante (+) penetra en el citoplasma de una célula receptora (-), la segunda es la cariogamia, en donde los núcleos se fusionan para formar un núcleo cigótico diploide, por último sucede la meiosis en la que se da origen a esporas sexuales haploides dentro de los cuales existen recombinantes genéticos (Tortora, 2007).

2.1 CLASIFICACIÓN

Los mohos respecto a su forma de reproducción han sido clasificados según Benitez en el 2003 como:

Phycomycetes: los cuales producen hifas no septadas que poseen núcleos a lo largo de toda su longitud. Se reproducen asexualmente mediante la producción de esporas.

Ascomycetes: Poseen hifas septadas, esporas sexuales en ascas con un número determinado (dos, cuatro, seis, etc), esporas asexuales.

Basidiomycetes: Presentan sacos o basidios a los cuales están adheridas las esporas.

Deuteromycetes: son conocidos como hongos imperfectos y se caracterizan por no poseer reproducción sexual.

2.2 CONDICIONES NUTRICIONALES DE LOS MOHOS

- Por lo general son aerobios.
- Son muy resistentes a las altas presiones osmóticas, pudiendo por lo tanto desarrollarse en concentraciones elevadas de azúcares y sales.
- Pueden desarrollarse en ambientes con bajo contenido de agua en comparación con las bacterias.
- Pueden metabolizar hidratos de carbonos complejos como la lignina, etc. (Madigan y col., 2001).

- El crecimiento de mohos se inhibe en contenidos de humedad menores a 14-15 %.
- A una actividad de agua (aw) de 0,62 cesan todas las posibilidades de crecimiento de mohos. A 0,70 es una aw suficiente para inhibir a la mayoría de mohos alterativos en alimentos.
- Pueden crecer bien en un pH de 2 a 8,5, encontrándose el óptimo en pH ácidos.
- Son mesófilos (25-30 °C), sin embargo algunos crecen bien a 35-37 °C, otros son psicrófilos y otros termófilos.

2.3 MOHOS Y ALIMENTOS

Los hongos pueden ser utilizados para un sinnúmero de beneficios para el hombre, entre los cuales se destacan muchos productos fermentados, bebidas etc. así como también son parte de la dieta de muchos países. Sin embargo los mohos pueden afectar los alimentos de tal manera que ocasionan pérdidas por deterioro fúngico de hasta un 25 % (Martínez, (1991) citando a la FAO). Poseen una capacidad de infestación de tejidos de plantas y frutas, invadir y descomponer cosechas, alimentos y bebidas procesadas, pueden producir metabolitos secundarios tóxicos (Benítez, 2003).

Martínez (1998), señala que la rápida multiplicación de mohos genera agua como subproducto metabólico y en conjunto con la elevación de la temperatura se produce aglomeración, trayendo como consecuencia directa el consumo de carbohidratos, proteínas y vitaminas del alimento por los mohos, reflejándose por ende en una pérdida del valor nutricional.

Bullerman (1984), clasificó a los mohos invasores de los granos de cereales según los requerimientos de humedad tal como:

Hongos de campo: Estos invaden el cariósido en desarrollo o maduro encontrado en la planta antes de la cosecha. Se requiere un contenido de humedad de 20 y 40 %. *Fusarium moniliforme* se encuentra dentro de esta clasificación.

Hongos de almacén: Se forman fuera o dentro del cariósido a niveles de humedad de 13 a 19 % en el almacén. Destacan los *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*

Hongos de descomposición avanzada: Estos se desarrollan en granos altamente deteriorados durante el almacenamiento requiriendo un contenido de humedad del 20 al 25 %. Destacan en esta clasificación las especies de *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* Y *Penicillium sp.*

2.4 LOS MOHOS Y SU IMPORTANCIA EN GRANOS DE CACAO

El ataque por mohos en el proceso de obtención del cacao es visto durante y después de la fermentación, predominando las especies de *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* según Sánchez y col, (2008) citando a Roelofsen, (1958); Broadent y Oyeniran, (1968). También el autor hace referencia a Oyetuni, (2006) para comentar al moho que con mayor frecuencia se ha encontrado en bebidas a base de cacao, correspondiendo al *Aspergillus*.

Esto trae consigo un grave problema ya que un número considerable de mohos son productores de micotoxinas, las cuales pueden ocasionar mutaciones, cáncer entre otros (Jay, 2002). Este último autor cita a Stark, (1980) para concluir que las aflatoxinas son las micotoxinas más potentes.

Los *Aspergillus* y *Penicillium* encontrados en el cacao son también productores de micotoxinas y por ende producen daños de diversos tipos a los humanos y animales (Moss, 1996).

2.5 DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS GENEROS DE MOHOS PRESENTES EN CACAO

Cladosporium: Este género se caracteriza por presentar hifas septadas con conidios negros que crecen como un árbol y se ramifican de formas diversas. En cultivo el crecimiento es a tercio pelado, presentando un color que varia del

aceitunado al negro. Algunas especies alteran la mantequilla y la margarina, mientras que otras producen una podredumbre a las frutas. Son hongos de campos que crecen sobre los granos de cebada y de trigo (Jay, 2002).

Rhizopus: Produce hifas no septadas que dan origen a rizoides y estolones. Los esporangióforos se desarrollan en grupos en los extremos de los estolones. *R. stolonifer* es la especie más frecuente en los alimentos. Producen la podredumbre blanda de las manzanas, las peras, las uvas, las frutas con hueso, los higos, entre otros. Muchas especies producen pectinasas (Jay, 2002) y lipasas (Rivera y García, 2007).

Geotrichum: Son generalmente blancos con hifas septadas y la reproducción tiene lugar mediante la formación de artroconidios en hifas vegetativas. Están relacionados en contaminaciones producidas en maquinarias industriales. Producen la putrefacción agraria de las frutas cítricas y de los melocotones y la alteración de la nata. Son muy difundidos en el ambiente (Jay, 2002).

Penicillium: La contaminación por estos mohos en alimentos varía del color azul al azul verdoso, siendo este último color, el que se relaciona con la podredumbre de frutas cítricas. Algunas especies producen citrinina, toxina del arroz amarillo, ocratoxina A, rubratoxina B y otras microtoxinas (Jay, 2002).

Aspergillus: Algunas de las especies de este género son xerofílicas. Aparecen de

color amarillo al negro pasando por el verde sobre un gran número de alimentos. Se ha relacionado con la podredumbre negra de frutas cítricas, higos, melocotones, entre otros. Algunas especies alteran los aceites, como el de palma, cacahuets o maíz. También han sido registrados como hongos de almacén que invaden las semillas. Producen glucoamilasas, lipasas, pectinasas y α -amilasas. Algunas especies producen aflatoxinas, mientras que otras producen acratoxinas A y esterigmatocitinas (Jay, 2002).

3. MICOTOXINAS Y SALUD PÚBLICA

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por los mohos, aparentemente cuando hay una alta cantidad de precursores de metabolitos primarios como son ácidos orgánicos, acetato, piruvato etc., por lo cual el moho de esta forma mengua las cantidades de estos precursores formando las micotoxinas. El autor señala que los metabolitos secundarios se producen en la fase final del crecimiento exponencial y que no son necesarios para el crecimiento o metabolismo del organismo productor (Jay, 2002).

López en el 2004 indica que los metabolitos secundarios guardan cierta relación independientemente del organismo que las sintetiza. Estas características son:

- Son producidos por unos pocos organismos.
- No son necesarios (hasta ahora) para el crecimiento y la reproducción.
- La síntesis de estos es muy dependiente de las condiciones ambientales.

- Algunos se forman como grupos de estructuras relacionadas.
- Ciertos organismos producen variedades de metabolitos secundarios.
- El control en la biosíntesis de metabolitos secundarios difiere en gran medida del metabolismo primario.

Según Bogantes y col, (2004) en el acta médica Costarricense afirman que los principales productores de aflatoxinas son los mohos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* cuyas toxinas son altamente cancerígenas y están relacionadas potencialmente con el cáncer de hígado y creen que actúan sinérgicamente con el virus de la hepatitis. Además, las aflatoxinas están involucradas en mutaciones puntuales y en múltiples malformaciones en el desarrollo fetal. Se han realizado estudios en modelos animales donde se ha verificado la producción de necrosis hepática, nefritis, congestión pulmonar, daño celular, carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad debido a una ingesta de estas micotoxinas. (Smith 1983, Massey y col., 2000. (Citados por Bogantes y col., 2000)).

Por todos los daños demostrados que producen las micotoxinas en animales y seres humanos y el papel que juegan en su producción los hongos *Aspergillus* y *Penicillium*. Sánchez y col (2008), recomiendan identificar la flora fúngica en el cacao. Así mismo, el mismo autor hace referencia al porcentaje de hongos aislados del cacao correspondiendo a un 51% para *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* 32,8%, otras especies de *Aspergillus* se encontraron en un 4,4%, *Penicillium* en un

6,6% y un 5,2% para otros hogos.

En general, los efectos directos de las micotoxinas sobre los humanos y los animales pueden incluir:

- Retardo en el crecimiento
- Desacoplamiento del sistema inmunológico
- Reducción a la resistencia a las infecciones
- Toxicidad aguda y muerte después de la ingestión de elevados niveles de micotoxinas
- Reducción de la producción de leche y huevos
- Formación de tumores debido a la exposición prolongada a pequeñas cantidades de toxinas (Raybaudi, 1999)

Diversos factores atacan la salud humana y animal por la ingestión de grandes cantidades de micotóxicas, lo cual dependerá según Anton y Lisazo, (2001) de:

- Tipo de micotoxinas y su toxicidad, biodisponibilidad y concentración en el alimento.
- Variedad de micotoxinas presentes y el sinergismo entre ellas para actuar con mayor potencia.
- Cantidad del alimento poseedor de las micotoxinas consumidas en el tiempo.
- Edad del individuo, peso y estado fisiológico.

Por lo general las micotoxinas comparten un bajo peso molecular lo que las hace poseer de una gran resistencia al calor, por lo cual los tratamientos térmicos (empleados en la conservación de alimentos) no son eficientes para inactivar dosis de micotoxinas con significado clínico (Benitez, 2003).

A continuación se presentaran algunas de las micotoxinas producidas por hongos en alimentos:

3.1 AFLATOXINAS

Fueron identificadas en 1960 siendo las de mayor importancia las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. Están constituidas por unidades cumarínicas sustituidas, anillos bifurano y configuraciones lactónicas. Son poco solubles en agua, insolubles en solventes no polares y completamente solubles en solventes moderadamente polares tales como cloroformo, metanol y dimetilsulfóxido (Fuenmayor, 1991). Este mismo autor indica que este tipo de micotoxinas a veces pueden soportar la esterilización sin gran pérdida de su potencial tóxico. Los principales productores de aflatoxinas son *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Romer (2000) indica que los límites para aflatoxinas B1 fijados por la FDA son :

- 300 ng/g en ganado para el consumo.
- 200 ng/g para cerdo acabado.
- 100 ng/g para crianza de ganado vacuno, cerdo y aves maduras.

- 20 ng/g para humanos y animales inmaduros (incluyendo aves).
- 0,5 ng/g en leche.

3.2 CITRININA

Esta micotoxina emite fluorescencia de color amarillo limón bajo luz UV de longitud de onda larga. Es producida por los hongos *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum* y otros hongos. Ha sido aislada en arroz descascarillado, en pan enmohecido, en jamones curados en el campo, en el trigo, en la avena, centeno, entre otros. La citrinina es un poderoso agente cancerígeno (Jay, 2002).

3.3 PATULINA

Es producida por un gran número de penicilios, especialmente por las especies *P. claviforme*, *P. expansum* y *P. patulum* y por algunas especies de aspergilos (*A. clavatus*, *A. terreus*, etc.). Algunos hongos productores de patulina lo pueden realizar por debajo de 2 °C. Ha sido encontrada en panes enmohecido, embutidos, plátano, peras, piñas americanas, las uvas, los melocotones, zumo de manzana, sidra y en otros productos (Jay, 2002).

3.4 OCRATOXINAS

Comprenden varios metabolitos relacionados desde el punto de vista estructural (ocratoxina A (OA), OB, OC, etc.), siendo la ocratoxina A la más tóxicas y sintetizada por hongos de almacenaje tales como *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. mellus* y otras especies de aspergilos. También la producción de OA

ha sido relacionada con algunos penicilios tales como *P. viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. variables*, etc. (Jay, 2002). Esta toxina ha sido encontrada en maíz, caraotas, semillas de cacao, judías de soja, tabaco enmohecido, cebada, jamones curados en el campo, café, frutas cítricas, entre otros.

4. ACEITES ESENCIALES PROVENIENTES DE PLANTAS

Los aceites esenciales son compuestos aromáticos aceitosos extraídos de diversos tejidos vegetales, tales como: raíces, frutas, maderas etc, a través de métodos químicos y biológicos como son el enfleurage, prensado, destilación y extracción (con solventes y/o con etanol) siendo el más utilizado el de la destilación (Van de Braak y Leijten, 1999).

Los aceites esenciales son comunes en hierbas tales como la salvia, romero, tomillo, mejorana, orégano, laurel y cilandro. Las especias tanto como las hierbas no pueden clasificarse como alimentos, pues sus valores nutritivos son muy bajos. Sin embargo son utilizadas para conferir sabores y aromas agradables en las comidas (López, 2004). Por otro lado, no hay estudios que indiquen efectos dañinos de las especias y hierbas sobre la salud humana, al contrario se han descrito efectos beneficiosos sobre la digestión, producción de saliva y dietas bajas en sodio (López, 2004 citando a Maistre, 1964; Rosengarten, 1969; Parri, 1969; Hardman, 1973).

La actividad antimicrobiana in vitro de muchos aceites esenciales ha sido probada en contra de *Escherichia coli*, *Listeria monocytógenes*, *Salmonella* spp., etc.,

encontrándose que la concentración necesaria para producir un efecto negativo en el crecimiento o inhibición de los patógenos, es mucho menor in vitro en contraste con las requeridas para un alimento en si (Burt, 2004). Así mismo, el autor cita a otros investigadores para referir la capacidad antifúngica de los aceites esenciales y sus componentes. Sin embargo según Basílico y Basílico, (1999) hacen hincapié en el frecuente uso de sustancias sintéticas preservativas antifúngicas las cuales presentan efectos carcinogénicos, teratogénicos y toxico residual.

Los aceites esenciales contienen una gran cantidad de componentes según la fuente de origen, los cuales pueden ser el thymol, carvacrol, cinnamon etc. Los aceites esenciales contienen una gran hidrofobicidad la cual le permite atravesar la membrana lipídica celular y por ende finalizar el suceso en la evacuación del contenido celular y posterior muerte. La acción antimicrobiana es mejorada en condiciones de bajo pH, baja temperatura y baja tensión de oxígeno. Observándose también un sinergismo entre combinaciones de compuestos antimicrobiales por ejemplo el carvacrol, cinamaldehido y eugenol (Burt, 2004). Por otro lado Cha y Chinnan, (2004), mencionan que la capacidad antimicrobiana del timol depende en gran medida de su contenido fenolítico. De acuerdo a diversas investigaciones, se ha comprobado que los fenoles de los aceites esenciales pueden inactivar ciertas enzimas que juegan un papel clave en la membrana celular o alterar el material genético de los microorganismos (S`egvic´ Klaric y col., 2006).

El modo de acción de los aceites esenciales es muy complejo y se cree que su efectividad está muy relacionada con el deterioro de sistemas enzimáticos incluyendo aquellos que están relacionados con la producción de energía y síntesis de compuestos estructurales (López, 1995 citando a Conner y Beuchat, 1984). Muchas veces el aumento de las concentraciones de un aceite esencial no se refleja en su efecto antimicrobiano. Los trabajos de Juven y col. (1994) demostraron que el aumento en las concentraciones del aceite esencial de tomillo, timol y carbacrol no eran directamente proporcional con el efecto antimicrobiano sobre *Salmonella typhimurium*. Sin embargo después de llegar a una cierta concentración crítica se presentó una rápida disminución el número de células viables de la bacteria. Los autores concluyeron los resultados argumentando que los compuestos fenólicos actúan sobre la membrana celular, saturando los sitios sobre los que ejercen efecto presentándose por ende un grave daño y colapso en la membrana celular perdiéndose los constituyentes del citoplasma

Es importante conocer el pH del medio en el cual actuarán las especies y hierbas, pues estos están relacionados con la actividad antimicrobial de los aceites esenciales, siendo los pH ácidos donde se ejerce mayor actividad antimicrobial, lo cual está relacionada con la solubilidad y estabilidad de los fenoles a esos pH (López, 1995). Al-Khayat y Blank (1985) reportaron que el 0,03 % de eugenol en un medio en el cual existían un número determinado de esporas de *Bacillus subtilis* capaces de germinar, estas disminuían conforme descendía el pH del medio de 8.0 a 6.0.

Concluyeron que el eugenol fue más efectivo a pH ácidos. Trabajo de Juven y col, 1994 demuestran el aumento de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo y del timol a pH 5,5 en contraste con el pH 6,5, atribuyendo tal efectividad a cambios en la distribución de los grupos polares de los fenoles de los aceites entre la membrana citoplasmática y el medio externo. Los grupos fenólicos a pH ácidos están sin disociar y poseen una acción antimicrobial mayor que en l forma disociada. Por ende los fenoles poseen un amplio rango de pH como conservadores alrededor de 3,5-8.0 (Kabara, 1991).

La inhibición del crecimiento de hongos se ha podido lograr cuando se combinan especias y antimicrobianos tradicionales, haciéndose menor la concentración a utilizar de los tradicionales. Los trabajos de Azzouz y Bullerman (1982) demostraron la capacidad antimicótica del clavo contra *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* y cuatro especies de *Penicillium* por 21 días. Encontraron efectos sinérgicos cuando utilizaron combinaciones de clavo (0,1 %) y de sorbato de potasio (0,1-0,3 %). Observaron un aumento en el tiempo de germinación de los mohos.

Para el entendimiento del efecto de los aceites esenciales en el desarrollo de los hongos se deben entender dos conceptos, los cuales son el de MIC (concentración mínima inhibitoria) y MFC (concentración mínima fungicida). El primero corresponde a la mínima concentración del aceite esencial que permite un desarrollo

de los hongos no más de un 20%. El segundo término indica la mínima concentración del aceite esencial que causa una completa inhibición en el desarrollo de los hongos (Štegić Klaric y col., 2006).

Existen varios trabajos experimentales que han podido determinar cantidades de ciertos aceites esenciales sobre diversos mohos:

En 1999, Basílico y Basílico determinaron la efectividad de aceites esenciales del orégano (*Origanum vulgare*), menta (*Menta arvensis*), basil (*Ocimum basilicum*), sage (*Salvia officinalis*) y coriander (*Coriandrum sativum*) en distintas concentraciones sobre la inactivación en el crecimiento micelar de *Aspergillus ochraceus* y la producción de ocratoxina A. Para ello el autor tomó concentraciones de 500, 750 y 1000 p.p.m. por cada aceite esencial y las inoculó con una metodología específica en caldo YES. En dichos caldo se inoculó concentraciones iguales y conocidas de esporas del moho y se dejó transcurrir el tiempo por 7, 14 y 21 días a 25 °C. El crecimiento micelar fue visto a través de la diferencia de peso y la producción de la aflatoxina A se observó a través de cromatografía en sílica gel. El resultado se tradujo en que el orégano y la menta a concentraciones de 1000 p.p.m inhibían por 21 días el desarrollo micelar y la producción de acratoxina A, mientras que el basil solo fue efectivo en esa concentración por tan solo 7 días. Por su parte a 750 ppm. el orégano fue efectivo por catorce días, mientras que la menta a tal concentración permitió el desarrollo del hongo pero no se observó la producción de acrotoxina A en

catorce días. Los aceites esenciales de sage y coriander no parecieron mostrar según los autores ningún efecto inhibitorio en el hongo ni en la producción de aflatoxina A.

Mahmoud (1994), estudió los efectos de los constituyentes de 20 aceites esenciales sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. Encontró que de los aceites estudiados sólo cinco de ellos lograron una total inhibición en el desarrollo del moho y su producción de aflatoxinas. Los aceites responsables de ello fueron el geraniol, renol, citionelol, cinamaldehyno y thymol. Para los tres primeros mostraron una concentración mínima inhibitoria de 500 ppm, mientras que para el timol y el cinamaldehydo fue de 200 y 250 ppm.

López (2004), comprueba el efecto de cuatro especias (clavo, laurel, orégano y pimienta) en medio líquido (extracto de levadura-sacarosa (YES)) y medio sólido (agar extracto malta (EMA)) sobre el desarrollo de *A. flavus*. Para ello tomó varias fiolas y les agregó varias concentraciones de cada una de las especias. Los resultados fueron evaluados en base a la producción de aflatoxinas y el crecimiento del moho. El autor encontró que el laurel tanto como el orégano no ejercen efecto inhibitorio alguno sobre el desarrollo miceliar del moho, a las concentraciones y tiempo de exposición utilizados. Por su parte, la pimienta a concentraciones de 1% y al cabo de 15 días ejerció un efecto inhibitorio en el desarrollo miceliar del moho, tal inhibición fue de un 50%. Mientras que a niveles de 0,5 y 0,1% se obtuvo una inhibición de 16 y 18% respectivamente. El crecimiento del hongo obtuvo una mayor inhibición con la

utilización de 0,5 % de clavo, siendo esta de un 78%. En cuanto a la producción de aflatoxinas, el orégano según el autor, indica que posiblemente ejerce un efecto estimulativo en su producción, ya que a concentraciones bajas (0 y 0,1%) no observaron la presencia de aflatoxinas, mientras que a las concentraciones de 0,5 y 1% sí observaron producción de aflatoxinas. Por otro lado, indican que el laurel posee un efecto inhibitorio en la producción de aflatoxinas, aumentando a medida que la concentración de laurel crecía. La pimienta y el clavo ejercieron un efecto negativo en la producción de aflatoxinas, siendo el clavo el de mayor efecto. Por su parte el efecto inhibitorio de las especies en el agar EMA sobre el moho (indica el autor), fue similar al visto en el caldo YES.

S̃ egvic' Klaric y col., (2006) probaron la efectividad antifúngica del aceite esencial extraído de la planta *Thymus vulgaris* L. y con el compuesto de timol puro, sobre hongos extraídos desde una pared húmeda. Para ello rasparon una pared húmeda y extrajeron 50 muestras de las cuales obtuvieron distintas especies de hongos. El aislamiento lo llevaron a cabo en agar glucosa suplementado con penicilina y estreptomina e incubaron a 25 °C durante 5 a 7 días. Posteriormente incubaron y realizaron un aislamiento en agar malta e identificaron los mohos según sus características macro y microscópicas, cuyos resultados diferenciales arrojaron las siguientes especies: *Aspergillus* (44%), *Penicillium* (18%) *Alternaria*, *Ulocladium*, *Absidia* y *Mucor* (8%) *Cladosporium*, *Trichoderma* y *Rhizopus* (6%), y *Chaetomium* (2%). La actividad antifúngica fue probada diluyendo doblemente el aceite esencial

extraído de la planta (timol) en etanol a distintas concentraciones (96 y 30 % v/v) y en agua destilada con solución 0,1% (m/v) Tween 80. La actividad antifúngica del timol puro se realizó empleando dos metodologías, por dilución en agar y utilizando una cámara de vapor encerrado en vidrio lo cual modificaba la atmósfera. Los investigadores concluyeron que el método de dilución para ambos compuestos (el aceite puro y el esencial de la planta) poseen una fuerte actividad antifúngica, siendo la mínima concentración inhibitoria (MIC) para ambos por debajo de 20 $\mu\text{g/mL}$, excepto para *Mucor* spp (50.20 $\mu\text{g/mL}$) y una MFC alrededor de 40 $\mu\text{g/mL}$ en los siete días de tratamiento. También observaron que el timol puro es tres veces más inhibitorio que el aceite esencial de la planta en el método por dilución en el agar utilizado sobre *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *absidia* y *Mucor*. Cuando emplearon la cámara de vidrio modificando la atmosfera de vapor con aceite esencial de la planta (82 $\mu\text{g/L}$) inhibió la esporulación de los mohos durante los 60 días de exposición.

Los investigadores concluyeron que el aceite esencial de timol posee un amplio rango de actividad fungicida. Ellos también observaron que la fase de vapor del aceite, exhibió una actividad inhibitoria prolongada sobre los mohos extraídos de la pared húmeda. La importancia de este estudio radica en que el aceite esencial extraído de la planta y el timol puro en bajas concentraciones pueden inhibir el crecimiento de diferentes especies de mohos.

4.1 ACEITES ESENCIALES Y ALIMENTOS

Son pocos los estudios de la actividad de los aceites esenciales en alimentos. Sin embargo, Shelef y col, (1984) indicaron que los aceites esenciales de especias y plantas, incluyendo sus componentes son menos efectivos cuando se aplican en alimentos que en medios microbiológicos. Tal pérdida de la eficacia del antimicrobiano conlleva a limitaciones en el uso de aceites esenciales y antioxidantes fenólicos en alimentos (Juven y col., 1994).

La disminución de la capacidad antimicrobial de los aceites esenciales (cuyos mayores constituyentes son fenoles) aplicados en alimentos, radica en las interacciones de los grupos fenólicos y las proteínas presentes en el alimento. Juven y col, 1972 concluyeron que la actividad antimicrobiana de oleuropeina disminuía con la adición de triptona o extracto de levadura al medio de cultivo.

López, (1995) cita a Spencer y col, (1988) para hacer mencionar que el acoplamiento entre fenoles y proteínas depende de las características de la proteína, del pH y de las características de la molécula que posee el grupo fenol

Por otro lado el efecto antimicrobial de los AE y antioxidantes se ve afectada por la presencia de compuestos lipídicos en los alimentos. Ahamad y Branenn (1981), agregaron pequeñas cantidades de lípidos en el medio (0,25) y comprobaron que la actividad antimicótica del BHA (butilhidroxianisol (antioxidante sintético permitido en alimento)) disminuía, siendo progresivo al aumentar las concentraciones

de grasa. Concluyeron que probablemente la presencia de lípidos en alimentos podría disminuir la actividad antimicótica del BHA debiéndose esto a la absorción del antioxidante en la grasa haciéndolo no disponible para como antimicrobiano. Esto fue comprobado por Anmad y Branenn (1981) en alimentos. Evaluaron la capacidad antimicrobiana del BHA en queso untable y puré de manzana, indicando que necesitaron mayor concentración del antioxidante en comparación con la utilizada en medios microbilógicos, para lograr una inhibición del crecimiento de *Penicillium expansum* y *Aspegillus flavus*. Se necesitaron 200 ppm de BHA en el puré de manzana y 400 ppm para el queso. Los autores explican la disminución de la efectividad antimicrobiana en base a la solubilidad del antioxidante en la porción lipídica o las interacciones de este con las proteínas presentes en el alimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIA PRIMA

Las muestras de granos fermentados y secos analizados, procedían de frutos maduros y sanos de cacao cultivados y cosechados por distintas fuentes o proveedores del estado Miranda. De las cuatro muestras de granos fermentados y secos de cacao proporcionadas, dos fueron codificadas como INIA I y II. Las mismas son una mezcla comercial de materiales híbridos procedentes del Campo Experimental “Padrón” de la estación experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), ubicado en la carretera Nacional vía a Oriente, del Municipio Ribas, parroquia Tapipa en el estado Miranda. Los frutos pertenecientes al lote 1 y usados para la obtención de la muestra de granos fermentados y secos se codificaron como “INIA I”, los cuales se cosecharon y beneficiaron en el mes de enero de 2011. Las dos muestras finales de granos fermentados y secos obtenidos a partir de un lote 2, conformado por frutos maduros y sanos de cacao se codificaron como “INIA II” y “empresa”. Este lote se cosechó y se benefició en el mes de julio de 2011 de la misma manera que las del lote I, a excepción de las condiciones de almacenamiento. La cuarta muestra de granos fermentados y secos se codificó como “productor” y fue suministrada en el mes de julio de 2011 por un productor y vendedor de granos de cacao en la misma zona (llamado vocero comprador). La muestra de granos se benefició según la tecnología postcosecha que acostumbra el productor a realizar en esa época.

1.1. EL BENEFICIO Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El beneficio (fermentación, secado y almacenamiento) se realizó según el método de fermentación de Álvarez y col., (2010). El proceso de fermentación duró cinco días con dos remociones de la masa. El secado al sol de los granos se realizó en un patio de cemento hasta obtener un contenido de humedad comprendido entre 6 y 8 %. La muestra de granos fermentados y secos de “INIA I” se colocaron en bolsas con cierre hermético y se almacenaron en el laboratorio dentro de cavas de anime con dimensiones de 45 x 30 x 29 cm (largo x ancho x alto) e introducidas en una cava de refrigeración industrial de 6 compartimientos de dimensiones: 1,74 x 74,0 x 1,78 (largo x ancho x alto), modelo W-3 y a una temperatura de refrigeración controlada. Las muestras de granos fermentados y secos de “INIA II” y “empresa” fueron colocadas en sacos de yute de 2 kg almacenándose la primera, en el laboratorio a temperatura ambiente y con adecuadas condiciones de ventilación; mientras que la segunda muestra, fue enviada a un galpón de almacenamiento de granos de cacao seco ubicado en un sector de la misma zona. La muestra del productor al igual que la de INIA I, se mantuvo en el laboratorio previo a los análisis microbiológicos y físico-químicos. A continuación se especifica las condiciones en que se almacenaron cada una de las muestras obtenidas:

Muestras	Fecha de beneficio	Condición de almacenamiento
INIA-I	Enero de 2011	Cava de refrigeración industrial durante 5 meses a $5,0 \pm 2^{\circ} \text{C}$.
INIA-II	Julio de 2011	En el laboratorio durante 2 meses con una temperatura y % HR* promedios de 26,0 a 28,2 °C y de 40,6 a 41,1% respectivamente.
EMPRESA	Julio de 2011	Galpón de almacenamiento durante 2 meses, con temperaturas y % HR* promedios de 28,0 a 30,2 °C y de 40,8 a 42,1% respectivamente.
PRODUCTOR	Julio de 2011	Cuarto o almacén durante 2 meses, con temperaturas y % HR* promedios de 28,0 a 32,0 °C y de 40,8 a 52,0 % respectivamente.

***% HR: porcentaje de humedad relativa**

1.2. TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La toma de muestra se efectuó utilizando la norma COVENIN 1339:1995 (granos de cacao. Toma de muestras) en su primera revisión.

Culminado el secado de los granos de cada lote (I, II y empresa), las masas fueron colocadas en los respectivos fermentadores para tomar cinco muestras primarias al azar con una paleta de madera, en distintos puntos del cajón (superior, centro y fondo). La muestra compuesta o final de 2 kg fue obtenida mezclando y homogenizando las muestras primarias. Todas las muestras se empacaron y

almacenaron según las condiciones de la tabla anterior. El muestreo para el productor se realizó desde los sacos mediante un punzón saca muestras, tomando al azar las muestras primarias hasta una tercera parte de los sacos. Considerando la parte superior, media e inferior de cada uno de los mismos. La muestra final de análisis fue de 2 kg de la masa de granos.

Las muestras de granos fermentados y secos con testa fueron molidas finamente y tamizadas hasta obtener una granulometría de 60 mesh. El polvo de cacao obtenido de cada muestra fue almacenada en bolsas tipo ziploc hasta los análisis físicos y químicos correspondientes. Para los análisis microbiológicos se utilizó el grano entero, o dependiendo de la evaluación a realizar se analizó la testa o el endospermo.

1.3. PRUEBA DE CORTE DE CALIDAD EN LOS GRANOS DE CACAO

Para determinar la calidad inicial de los granos de cacao fermentados y secados al sol se procedió a efectuar un análisis visual de las dos caras del cotiledón para determinar los posibles defectos físicos que puedan presentar el grano, así como el grado de fermentación. La prueba describe los porcentajes de granos planos y partidos, pizarrosos, picados por insectos, mohosos, germinados, granos dobles, insuficientemente fermentados y fermentados, siguiendo las indicaciones de la Norma Venezolana COVENIN-442:1995 en su 1^{ra} Revisión.

2. ANÁLISIS PROXIMAL DE LOS GRANOS DE CACAO.

Se procedió a realizar el análisis proximal a las diversas muestras de granos de cacao a fin de evaluar su composición química al momento del análisis microbiológico, utilizando los Métodos Oficiales para el Análisis de la Asociación Oficial de Análisis Químicos (Official Methods of Analysis of the Association Official Analysis Chemists (AOAC)), para lo cual se realizó:

Determinación	Método
Humedad	A.O.A.C. Official Method N° 970.20, 2000
Cenizas	A.O.A.C. Official Method N° 972.15, 2000
Proteína Cruda	A.O.A.C. Official Method N° 955.04, 2000
Grasa Cruda	A.O.A.C. Official Method N° 963.15, 2000
Fibra Cruda	A.O.A.C. Official Method N° 930.20, 2000

El contenido de otros carbohidratos se calculó restando del 100% con el resto de los macronutrientes anteriormente determinados.

3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS GRANOS DE CACAO

El pH y la acidez es un parámetro muy importante ya que está íntimamente relacionado con la conservación y almacenamiento de los alimentos, así como también en el control de procesos naturales e industriales en el alimento (Álvarez, 1998). A fin de conocer los cambios de los granos de cacao fermentados y secos durante el almacenamiento se procedió a analizar lo siguiente:

Determinación	Método
pH	A.O.A.C. Official Method N° 970.21, 1990
Acidez total titulable	A.O.A.C. Official Method N° 942.15, 1990

4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

4.1. RECUENTO DE MOHOS TOTALES E IDENTIFICACIÓN

Se analizaron 4 muestras (INIA I, II, empresa y productor) de granos de cacao fermentados y secados al sol, utilizando la siembra por superficie para determinar el contaje total de mohos. Se pesó asepticamente 11 g. de cada muestra y se diluyó con 99 mL de agua peptonada al 0,1% lo que constituye la dilución 1/10. Se realizaron las diluciones seriadas pertinentes. De cada dilución se tomaron alícuotas por duplicado de 0,1 mL y se colocaron en placas de Agar Dicloran Rosa de Bengala (DRBC), el cual es un medio selectivo para mohos y levaduras. Este medio posee rojo de bengala la cual reduce el crecimiento de bacterias y disminuye la dispersión de las colonias de los hongos, este compuesto es absorbido por los hongos y levadura lo cual facilitará su recuento. La presencia del cloranfenicol aumenta la selectividad del medio (Manual Básico de Microbiología CULTIMED, 2003). Posteriormente, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente de 5 a 7 días, transcurrido el tiempo se procedió al contaje de los mohos y los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g). Para la identificación de la especie más

abundante, se aislaron las colonias de mohos en agar extracto de malta (EMA) y se clasificaron de acuerdo a sus características macro y microscópicas según la clave taxonómica propuesta por Samson y col, 1995. El agar EMA es selectivo a través de su pH ácido (Manual Básico de Microbiología CULTIMED, 2003).

Los análisis se realizaron por triplicado para un estadístico significativo.

4.2. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE INFESTACIÓN

Se tomó una porción de 50 granos de cacao de cada muestra y se colocó en un recipiente que contenía hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,4% por 2 minutos. Luego se procedió a decantar el NaClO, y se realizaron dos lavados sucesivos con agua destilada esterilizada de los granos. A continuación, los granos fueron secados con unas servilletas estériles y se colocaron los 50 granos del cacao en placas de agar DRBC (3-4 granos por placa), estas placas se incubaron a temperatura ambiente durante 5 a 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a determinar el grado de infestación en porcentaje, según la cantidad de granos infestados.

4.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD TOXIGÉNICA DE LAS CEPAS FÚNGICAS AISLADAS

La evaluación toxicogénica se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Filtenborg y Frisvad, citada por Samson y col., (1995).

Después de haber clasificado taxonómicamente las cepas de mohos aisladas de los granos de cacao fermentados y secados al sol de cada muestra analizada, se

escogieron aquellas colonias de mohos que presuntivamente pudieron ser o no micotoxigénicas. A cada colonias aislada se les añadió una o dos gotas de solución de cloroformo/metanol (2:1). A continuación, se dejó secar la colonia y a partir de allí se tomó del centro de esta y con ayuda de un asa una porción de la masa micelial. La porción tomada se transfirió hacia un punto de la placa de TLC. Dicho punto no excedió los 8 mm de diámetro. A partir de este punto se procedió a realizar una cromatografía en capa fina. La placa con el punto, se pasó a un tanque cromatográfico, el cual contenía el solvente TEF (tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (90%), 5:4:1), el CAP (cloroformo/acetona/isopropanol, 85/15/20) y el TAM (tolueno/acetona/metanol, 5:3:2). El desarrollo de la cromatografía duró aproximadamente 45 minutos. Luego la placa fue retirada para la evaporación del solvente y se calcularon los R_fg de cada corrida, vistos bajo la luz UV 366nm. A partir de valores estandarizados de R_fg y del color característico bajo la luz UV, se determinaron las micotoxinas producida por cada moho.

5. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE TIMOL SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA FLORA FÚNGICA PRESENTE EN LOS GRANOS DE CACAO

5.1. MEDIO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

La evaluación del efecto inhibitorio del aceite esencial de timol sobre la flora fúngica se llevó a cabo en: Medio sólido (EMA) y por aspersión directa sobre los granos de cacao fermentados y secados al sol suministrados por un productor independiente.

El aceite esencial de timol se adquirió a través de la empresa Sigma Aldrich con una pureza mayor al 99,5 %.

5.2. PREPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL (AE) DE TIMOL

Las soluciones del aceite de timol se prepararon en etanol al 95%.

5.3. EVALUCACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL TIMOL SOBRE EL DESARROLLO DE LOS MOHOS EN MEDIO SÓLIDO

Se colocaron en fiolas de 250mL 90mL de agua destilada y la cantidad de agar EMA necesaria para 100mL de solución. Luego se esterilizó. Por otro lado se prepararon las distintas soluciones de timol en 10mL de alcohol al 95%. Tales soluciones se mezclaron asépticamente con el agar a una temperatura de alrededor de 55 grados centígrados (con esto se garantizó la no interferencia del alcohol en el efecto antifúngico del timol). Al final se obtuvieron concentraciones de timol de 500, 1000 y 5000 ppm. Estos agares se sirvieron en placas de Petri y se dejó solidificar. Posteriormente, se transfirió una espora del moho a evaluar con una aguja estéril y se inoculó el agar (se realizó por triplicado), este se incubó durante 7 a 10 días a temperatura ambiente, realizándose las medidas del radio del moho cada dos días por 30 días. El control en esta parte experimental consistió en la inoculación del moho a evaluar en agar EMA en placas de Petri.

5.4. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL TIMOL SOBRE EL DESARROLLO DE LOS MOHOS PRESENTES EN GRANOS DE CACAO FERMENTADOS, SECADOS AL SOL Y ALMACENADOS POR 25 DÍAS

Se prepararon distintas concentraciones de la sustancia de timol a asperger. Primero se agregaron asépticamente en beaker de 50mL 0,025; 0,05 y 0,1 g de timol, mezclándose con 10mL de alcohol al 95%. Luego por aspersión se regó las distintas sustancias de timol preparados, sobre 90 gramos de granos de cacao fermentados y secados al sol, almacenados por dos meses y suministrados por un productor independiente. Se obtuvo entonces con esta aspersión concentraciones en granos de cacao de 250, 500 y 1000 ppm de timol. Los granos se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas herméticas. Se realizó el conteo de mohos en agar DRBC de los granos a los 6 y 25 días de almacenamiento, así como su identificación. El control en esta parte experimental consistió en el almacenamiento en bolsas herméticas de los granos de cacao sin ninguna aspersión. Todo se realizó por triplicado

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Se realizó una prueba de t de students para verificar si existían diferencias significativas entre los contajes de mohos obtenidos en las muestras analizadas, igualmente se realizó para los porcentajes de infestación. Se calcularon las distintas desviaciones estándar en los experimentos realizados. En cuanto al experimento de inactivación, se realizó un análisis de varianza para ver si existían diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el efecto de las diferentes

concentraciones del AE sobre el o los mohos. También se aplicó un ANOVA para la observación de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los parámetros fisicoquímicos determinados y el tipo de almacenamiento. Para todos los análisis se usó el paquete estadístico statgraphics plus 5.1

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. PRUEBA DE CORTE

La prueba de corte de calidad es un parámetro de suma importancia ya que representa de una manera cualitativa el estado inicial del grano de cacao y con ello el descarte o aceptación de estos para su procesamiento de una manera industrial o artesanal (COVENIN, 1995) .

La prueba de corte realizada a los granos de cacao provenientes de las diferentes fuentes indicaron los siguientes resultados (Tabla 1):

El porcentaje de granos fermentados fue de 64, 78, 80 y 79 % para el productor, empresa, INIA II y I respectivamente. Ubicándose estos dos últimos según la Norma Venezolana COVENIN 50-1995 en un tipo de cacao Fino de primera (F1). El cacao del productor no poseía un número considerable de granos fermentados para entrar en la clasificación de la norma, lo cual indica que este cacao no fue sometido a una buena fermentación. Esto refleja la cantidad de granos insuficientemente fermentados, cuyo valor fue de un 12 %. Cabe destacar que los granos insuficientemente fermentados, pueden ser indicio de un mal procesamiento de la fermentación o una recolecta de la mazorca antes de la madurez del fruto. Lo cual pudo haber inferido en la contaminación de los granos por mohos (Guzmán, 2007).

Tabla 1. Prueba de corte de calidad (COVENIN N° 50, 1995)

Características físicas del grano fermentado y seco	PRUEBA DE CORTE DE CALIDAD			
	Productor	Empresa	INIA II	INIA I
% granos planos y partidos	16	5	8	8
% granos dañados por insectos	2	5	0	0
% granos mohosos	4	3	2	4
% granos dobles	2	0	0	1
% granos insuficientemente fermentados	12	9	10	8
% granos fermentados	64	78	80	79

En cuanto al porcentaje de granos partidos se observa que los granos beneficiados y almacenados por el productor presentan el mayor porcentaje (16%), seguido de los granos del INIA en sus lotes I y II y por último los granos de la empresa. Los granos del INIA II y los granos provenientes de la empresa representan una continuidad, ya que fueron beneficiados en el INIA y almacenados tanto en el INIA como en la empresa. En el INIA el porcentaje de granos partidos fue mayor en comparación con el que presentaron los granos almacenados en la empresa. Esta diferencia puede ser producto del almacenamiento dado por ambas, siendo el de la

empresa en el que se observó menor ruptura del grano. Los límites del porcentaje de granos planos y partidos que indica la Norma COVENIN están en un rango de 3 a 5 %. El productor está muy por encima de la Norma al igual que el INIA I e INIA II y la empresa está en el límite de la norma (Tabla 1). Ramos y col. (1993) indican que la cantidad de granos partidos o que presenten agujeros quedarán expuestos a la penetración de mohos o insectos que deteriorarán el grano. Siendo este defecto adquirido durante el beneficio del cacao, con la cosecha, el secado y el almacenamiento.

El porcentaje de granos dañados por insectos fue de 2 y 5 % para el productor y la empresa respectivamente. No se encontraron indicios por picaduras por insectos en las muestras de granos del INIA I y II. Estas diferencias se pueden atribuir al cuidado del almacenamiento brindado por cada proveedor siendo el almacenamiento realizado por el INIA el que impidió el contacto con insectos. El rango máximo de granos picados por insectos dictados por la norma COVENIN es de 2 a 3 %, siendo aceptable para el porcentaje encontrado por el productor, INIA I y II e inaceptable para los granos almacenados en la empresa.

El porcentaje de granos mohosos se encuentra en mayor número en las muestras del productor y del INIA I con un 4 %. Se encontró un 3 y 2 % para las muestras almacenadas en la empresa y en el INIA II respectivamente. Según la norma COVENIN el rango máximo permisible es de 2 a 3 %. Cumpliendo con esto las dos

últimas muestras nombradas. El porcentaje de mohos encontrados por la prueba de corte para el productor y el INIA I, corresponden con la prueba microbiológica en la alta incidencia de mohos total determinado.



Figura 4. Granos de cacao después de haber sido cortados en la guillotina en la realización de la prueba de corte de calidad

1.1 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LOS GRANOS DE CACAO CON TESTA

A continuación se muestran los resultados del análisis químico proximal de las muestras de granos de cacao almacenadas y evaluadas microbiológicamente. Debido que el almacenamiento de los granos de cacao se realiza en forma entera con su testa, se caracterizó químicamente el grano comercial con la testa correspondiente (Tabla 2).

Tabla 2. Composición química proximal (% base seca) de los granos de cacao fermentados- secos (con testa) y con distintos almacenamientos.

Muestras	Humedad (%)	Cenizas (% b.s)	Proteína cruda (N x 6,25) % b.s	Grasa cruda (% b.s.)	Fibra cruda (% b.s)	Otros Carbohidratos (%)
INIA I	8,07 ± 0,08 a	4,56 ± 0,09 ab	15,50 ± 0,10 a	40,30 ± 0,04 b	16,90 ± 0,51 b	14,67 ± 0,76 b
INIA II	7,28 ± 0,20 b	4,82 ± 0,12 a	12,93 ± 0,01 c	41,39 ± 0,29 a	15,75 ± 0,11 c	16,40 ± 0,33 a
Empresa	7,13 ± 0,28 b	4,51 ± 0,08 ab	14,37 ± 0,15 b	41,37 ± 0,10 a	15,74 ± 0,04 c	16,84 ± 0,43 a
Producto r	6,90 ± 0,07 c	4,08 ± 0,05 b	14,58 ± 0,05 b	39,05 ± 0,18 b	21,27 ± 0,01a	13,63 ± 0,85 c

Las letras indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

1.2 CONTENIDO DE HUMEDAD

El contenido de humedad de los granos de cacao fermentados y secos cumple con lo señalado en la norma COVENIN 50 de 1995, en la cual se establece un contenido de humedad máximo del 8% para facilitar el almacenamiento, transporte, manejo y comercialización del cacao. Al realizar el ANOVA se obtuvo que los valores de humedad de las muestras fueron estadísticamente significativos (p<0,05) entre los diferentes almacenamientos pero dentro del rango que establece la norma. La humedad obtenida al final del secado es apropiada porque impide el crecimiento de hongos en el almacenamiento y que el grano se quiebre fácilmente (Rohan, 1964). En este caso, el tipo de almacenamiento no afectó la humedad en las muestras evaluadas. El contenido de humedad de los granos de cacao fermentados y secos analizados en este estudio están acordes con los encontrados por Nogales y col.,

(2006) y Álvarez y col., (2010), lo cual es indicativo de que el secado se ha realizado a una velocidad constante y progresiva a pesar de las fuertes y cambiantes condiciones climáticas de la zona. Por otro lado, Los hongos pueden inhibirse con bajos contenidos de humedad (por debajo de una actividad de agua del 0,65 % (Jay, 2002)) sin embargo esto no implica la muerte del microorganismo, por ende la cantidad de esporas pueden estar latentes en el alimento y adquiridas durante el beneficio del cacao. De allí la importancia en la identificación de puntos críticos de control en la contaminación de mohos desde la cosecha hasta el almacenamiento.

1.3 CENIZA

El ANOVA con un nivel de significancia de 5% ha mostrado que no existen diferencias significativas entre los contenidos de cenizas de las muestras beneficiadas y evaluadas, mostrando un rango comprendido de $4,08 \pm 0,05$ a $4,82 \pm 0,12$ %. Al comparar con la bibliografía, se observa que los resultados presentados en este trabajo, están por encima a los presentados por El`Khorri (2006); Álvarez y col. (2010) y Nogales y col., (2006); quienes reportaron valores de cenizas de 3,25%, 3,09% y 3,52% en granos de cacao beneficiados (sin testa) provenientes de la región de Chuao, Barlovento y Cuyagua respectivamente. Es posible inferir que la pérdida por difusión de minerales se vea limitada por la disminución de la velocidad de reducción de la humedad en el secado y de un efecto aditivo por la testa o la cubierta que protege el grano de cacao.

1.4 PROTEÍNA CRUDA

En el secado, la proteólisis que se inicia durante la fermentación continúa, siendo favorecida la actividad de la proteinasa aspartica y de la carboxipeptidasa por las temperaturas alcanzadas durante la exposición al sol. Estas enzimas originan aminoácidos hidrofóbicos libres y péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos, cuya concentración desciende rápidamente al aumentar la temperatura durante el secado (Puziah y col., 1999). El máximo valor encontrado en granos frescos de cacao ha sido de 17,45% de materiales provenientes de Cumboto (Ortiz de Bertorelli y col., 2009). El comportamiento presentado por las proteínas fue variado, el mismo es comprobado al ver que el análisis estadístico ($p \leq 0,05$) reveló que existen diferencias significativas entre las muestras almacenadas. Graziani de Fariñas y col., (2002) analizaron muestras de mezclas de granos de cacao que presentaron comportamientos distintos de composición proteica durante la fermentación. Estos autores señalan que dicho contenido proteico tendía a aumentar a medida que se avanzaba en el proceso de fermentación en muestras de pulpa más testa. Estas reacciones pueden verse favorecidas por la acción de microorganismos.

Los resultados presentados en este estudio son mayores comparados a los obtenidos por Nogales y col., (2006), quienes reportaron un valor de 13,19 % y 12,65 % de proteína cruda para el grano de cacao fermentado en dos diseños de fermentadores y secado al sol de la región de Cuyagua. Sin embargo, Ortiz de Bertorelli y col., (2009), reportaron para el grano de cacao fermentado y secado al sol

de tipo Criollo un valor de 16,26% y para el cacao Forastero de 14,32%, observándose que el tipo de material genético tiene un efecto significativo sobre los cambios de esta variable durante la fermentación (Graziani de Fariñas y col., 2002). En relación a la frecuencia de remoción de la masa, cada 24 y 72 horas no reportaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de proteínas. Sin embargo, la frecuencia de remoción de la masa puede afectar la cantidad de mohos totales en los granos, según los autores anteriores. Existe una variabilidad en el contenido de proteína para las todas las muestras de INIA y almacenadas de distintas formas, lo cual indica que el efecto de cosecha, tipo de material y tratamiento post cosecha afectan sus contenidos. Ahora bien, el valor de la proteína cruda correspondiente para la muestra “empresa” (14,37%) proveniente del mismo lote de INIA II, no se considera lógico puesto que fue sometida a un mismo protocolo de beneficio y de almacenamiento. Es posible que haya ocurrido una alteración proteica debido a la incidencia de mohos en el grano, no obstante se deben continuar estudios para ofrecer una conclusión contundente de la influencia de la microbiota en el contenido proteico de granos de cacao beneficiados y almacenados.

El almacenamiento dado al lote II de granos de cacao por la empresa y el INIA II afectó solamente el contenido proteico. Sin variación alguna en el resto de los componentes del análisis proximal. La variación proteica, mayor en la empresa, pudo corresponderse con su alto contenido de granos dañados por insectos (alta presencia de insectos en el interior del grano) y mohos.

1.5 GRASA CRUDA

La manteca de cacao es un importante componente en los productos de cacao (chocolate y licor de cacao), corresponde a la fase continua y es por lo tanto responsable de la dispersión de muchos de sus constituyentes. La manteca determina la dureza del chocolate a temperatura ambiente, provee brillo, una rápida y completa fusión en la boca. Tiene un color amarillo, frágil a temperaturas menores que 26.7°C y una completa fusión a los 35°C (Minifie, 1989). Es bien conocido que la grasa es el componente principal y cuantitativamente mayoritario en las almendras de cacao, corresponde aproximadamente a más o menos el 50% de la composición según el tipo de material genético y a la época de cosecha. Ortiz de Bertorelli y Graziani de Fariñas, (1995) y González y col., (1999) han señalado que en los cultivos venezolanos se han obtenido entre el 48,80% y 54,91% de grasa en los granos frescos de cacao; mientras que Acosta y col., (2001) reportaron valores de grasa de 49,52%, 50, 99% y 52,24% para los cacaos de tipo Forastero, Criollo y Trinitario respectivamente. Álvarez y col. (2007) encontraron que el contenido de grasa cruda varió entre el 54,61 a 56,07% en los granos beneficiados y tostados de cacao provenientes de genotipos seleccionados cultivados de la región de Cuyagua, Edo. Aragua. Se observa que los valores obtenidos en este estudio están por debajo a los reportados por los autores anteriores. Los menores valores del contenido de grasa correspondieron para las muestras del “productor” ($39,05 \pm 0,18$ %) y de INIA I (almacenada en refrigeración) con $40,30 \pm 0,04$ %; posiblemente la variación se debe a

un efecto significativo del almacenamiento sobre estas muestras, debido a una degradación de naturaleza química o fúngica ya que diversos mohos sintetizan enzimas lipolíticas (Rivera y García, 2007) las cuales degradan los triglicéridos, infiriendo esto en el contenido de grasa y acidez. Sin embargo, hay que profundizar los estudios de estabilidad de la grasa durante todo el almacenamiento de los granos, a fin de determinar con certeza la participación de mohos en la degradación de la grasa para granos con testa y sin testa. Diversas investigaciones han reportado que el contenido de grasa, así como sus índices químicos (por ejemplo el índice de yodo), varían según el tipo de cacao (Liendo y col., 1997); su composición de ácidos grasos y acidez varían según la época de cosecha (Alvarado y col., 1983) citados por Acosta y col., (2001).

1.6 FIBRA Y OTROS CARBOHIDRATOS

Los valores de fibra cruda y de otros carbohidratos fueron estadísticamente similares entre las muestras codificadas como “INIA II” y “empresa”. La muestra “productor” presentó el más alto valor de fibra cruda ($21,27 \pm 0,01$ %) y el más bajo en el contenido de carbohidratos totales ($13,63 \pm 0,08\%$), lo que indica que es una característica específica del tipo de material genético que dispone el productor en su parcela productiva, que lo diferencia de los materiales híbridos seleccionados y cultivados en el INIA-Miranda.

Guzmán, 2007 reportó valores de otros carbohidratos en granos de cacao beneficiados de la región de Barlovento de 16, 94 %, lo cual corresponde con los

valores reportados en este estudio a excepción en los granos del productor. Se podría inferir en el efecto deteriorativo de los mohos sobre el contenido de estos carbohidratos.

Lares, (2007) reportó valores de fibra cruda de 17,47 a 18,46 % en muestras beneficiadas de cacao de la región de Chuao (cosecha San Juanera), lo cual corresponden con los reportados en este estudio, a excepción de la muestra del productor. Esto pudo haber sido influenciado por la época de cosecha y el tipo de material genético. Debe seguirse con los estudios de variación en la fibra cruda durante el almacenamiento de los granos de cacao y compararse con los de los granos sin testa, con el fin de determinar la influencia de la testa en el contenido de fibra.

2. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

2.1 pH Y ACIDEZ TITULABLE

Durante la fermentación, los ácidos acético y láctico son producidos por degradación microbiana de la pulpa y difundidos hacia el interior del cotiledón aumentando los niveles de acidez los cuales disminuyen durante el secado (Meyer y col., 1989).

En la tabla 3, se observan los valores de pH y acidez total titulable para los granos evaluados microbiológicamente. Estas variables se encuentran en un rango diferente al reportado por Ortiz de Bertorelli y col., (2009); quienes encontraron valores de pH 6,00 y de 0,73% de acidez para los granos de cacao fermentados y

secados al sol de tipo Criollo; pH 6,20 y de 0,65 % de acidez para el tipo Forastero, sin encontrar ningún efecto de variabilidad en la frecuencia de remoción de la masa en fermentación.

Tabla 3. pH y acidez total titulable de las muestras de grano de cacao fermentadas y secadas al sol.

Muestra	pH	Acidez total titulable (%)
Productor	5,04 ± 0,02 b	1,45 ± 0,04 b
Empresa	5,03 ± 0,01 b	1,24 ± 0,06 c
INIA II	4,99 ± 0,01 c	1,54 ± 0,02 a
INIA I	5,64 ± 0,02 a	0,89 ± 0,03 d

Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)

Los valores reportados en este estudio están por debajo (a excepción los granos del INIA I) a los obtenidos por Álvarez y col. (2010) en granos fermentados y secados al sol de muestras de cacao de tipo trinitario provenientes de Curiepe en la región de Barlovento.

Ortiz de Bertorelli y col. (2003) reportaron valores inferiores de pH y acidez de 4,84 y 1,08% respectivamente, en muestras de cacao de Cumboto, probablemente esta discrepancia se deba a la utilización de distintos materiales de cacao y procesos de beneficio. Jinap y Dimick (1990), indicaron valores de pH que cae en el rango entre 5,50 a 5,80, los cuales están por encima de los reportados en este estudio, pero concuerdan con la muestra de alto pH del INIA I.

3. ANALISIS MICROBIOLÓGICO

3.1 RECUENTO DE MOHOS TOTALES

3.2 Muestra del INIA lote I. Contaje de mohos en la testa (cascarilla), grano entero y endospermo.

El recuento de mohos totales encontrados en la testa, el grano entero y el endospermo que fueron almacenado durante cinco meses por separado, se determinó utilizando la técnica de siembra por superficie en agar DRBC.

Los resultados correspondientes al recuento de mohos totales para los diferentes constituyentes del grano se pueden observar en la tabla 4, figura 5. En los granos enteros se obtuvo un recuento de $4,83 \log_{10}\text{UFC/g}$, mientras que en la testa fue de $2,50 \log_{10}\text{UFC/g}$. En el endospermo el recuento de las unidades formadoras de colonias fue < 10 . Al realizar el análisis estadístico a dichas muestras se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre ellas. Estos resultados indican que el grano entero posee el mayor recuento de unidades logarítmicas formadoras de colonias por gramo, seguido de la testa y por último el endospermo. Esto refleja que una separación del grano de cacao en sus partes (testa, grano entero y endospermo) inmediatamente después del secado al sol, evita la colonización de los mohos presentes de manera natural de la testa hacia el endospermo que fueron almacenados en bolsas plásticas cerradas y refrigeradas.

Sin embargo, la eliminación de la testa (cascarilla) del grano de cacao antes del tostado trae como consecuencia el no poder lograr un control del tostado lo cual conlleva a la pérdida de ciertos olores y sabores que se producen durante este proceso, trayendo como consecuencia la obtención de un cacao que no podrá ser destinado a la elaboración de chocolates finos de aroma. No obstante, tiene como ventaja que evita la difusión de las grasas del cotiledón hacia la cáscara, por ende hay menor pérdida nutricional (Martin, 1987).

Por otro lado, la mayor presencia de mohos en el grano entero que en la testa, puede ser motivado por el alto contenido de nutrientes que presenta el grano entero, el cual contiene el endospermo, lugar donde se va a desarrollar el embrión. Por ende, los mohos tendrán los nutrimentos necesarios para su desarrollo en el grano entero y su nivel aumentará en comparación con la testa, la cual posee un contenido menor de grasas, proteínas, carbohidratos, vitaminas etc.

Tabla 4. Niveles de mohos en el grano entero, testa y endospermo de las muestras del primer lote del INIA

Parte analizada del grano INIA lote I	Log₁₀(UFC/g)*
Grano entero	4,87 ± 0,01 a
Testa	2,50 ± 0,09 b
Endospermo	<1x10 ⁻¹

*Promedio de tres réplicas ± la desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas (P<0,05). UFC indican unidades formadoras de colonias.

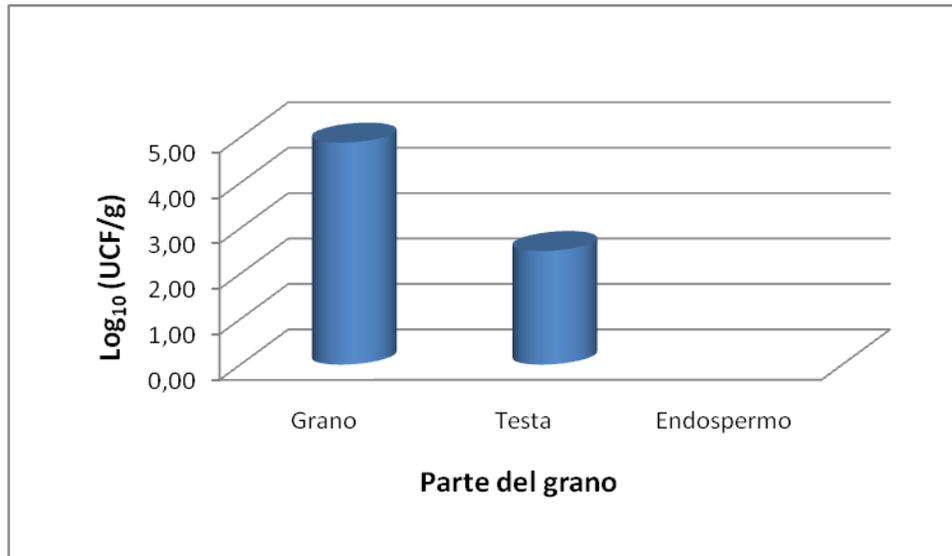


Figura 5. Niveles de mohos en el grano entero, testa y endospermo del cacao del Lote I INIA.

3.3 Recuento de mohos totales en granos de cacao beneficiados y almacenados por el INIA, Empresa y un Productor independiente.

La tabla 5, muestra los resultados en los niveles de mohos encontrados en muestras de cacao beneficiadas y almacenadas por el INIA (lote I y II), muestras del INIA lote II almacenadas por una Empresa en galpones y muestras de un productor independiente. Al realizar el análisis de varianza (ANOVA), se observó que hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el nivel de mohos encontrados en cada muestra, siendo los granos beneficiados y almacenados por dos meses por un productor los que presentaron mayor recuento de mohos totales ($5,24 \log_{10} \text{ UFC/g}$), seguida por las del INIA I ($4,87 \log_{10} \text{ UFC/g}$) almacenadas por cinco meses, y las muestras de la empresa y del INIA II que presentaron un recuento de $3,76 \log_{10} \text{ UFC/g}$ y $2,33 \log_{10} \text{ UFC/g}$ respectivamente. En la tabla 5 también se puede observar que las desviaciones

estándar del recuento de mohos totales tanto para los granos del productor como para los de la empresa son altas, lo que indica que los mohos no están distribuidos de manera homogénea en todos los granos de cacao almacenados. La figura 6 muestra una manera visible las diferencias en el recuento de los mohos en los granos.

Las muestras del INIA lote II y las del empresa provienen de un mismo beneficio pero almacenadas en distintas condiciones. Por ende se podría decir que las diferencias encontradas en el recuento de mohos en ambas es debido a las condiciones de almacenamiento empleadas por ambas instituciones, pues la cosecha, así como la fermentación y el secado al sol fueron realizados por el INIA. Se sabe que las condiciones de almacenamiento pueden interferir en la proliferación de hongos en los granos de cacao. Así pues Christensen, (1978) señaló que la humedad inicial del grano y la temperatura del almacén son los factores más importantes en la proliferación de mohos y sus toxinas. Así mismo, Christensen, (1978) y Neegard, (1979) indicaron que en malas condiciones de almacenamiento llegan a proliferar los hongos rápidamente, cuando el contenido de humedad del grano está en equilibrio con la humedad relativa en un rango de 65 y 90 %. Los granos de cacao son higroscópicos y pueden adquirir humedad del ambiente, lo cual puede ser un componente a favor del crecimiento de mohos. Sin embargo, los porcentajes de humedad determinado en las distintas muestras utilizadas en esta investigación concordaban con los ofrecidos por la norma COVENIN por lo que no pudieron interferir en la proliferación de hongos. También, otros factores intervienen en la

proliferación de hongos en almacén como son la genética o variedad de la planta (Zambettakis y col, 1981), así como las malas prácticas agronómicas y la época de cosecha, mencionados en los estudios de los cultivos de maíz correlacionados con la infección con *A. flavus* por Jones y col, (1981).

En el estado Miranda, la época de cosecha de los granos fue en Enero y Julio, meses en los cuales llovió mucho y por ende el número de mohos en el ambiente debió aumentar.

Algo importante de destacar en la proliferación de mohos en los granos almacenados, lo constituye la ventilación del almacén, pues un estancamiento del aire induce al desarrollo de mohos. Los galpones de la empresa donde fue almacenada la muestra “empresa”, no poseen un sistema de ventilación para los granos almacenados allí, además, realizan una clasificación inadecuada de los sacos que la empresa adquiere. Así mismo la empresa no toma en cuenta el porcentaje de humedad, el resultado de la prueba de corte, etc, que presentan los granos, colocando los sacos de granos de cacao en un mismo espacio, induciendo con esto a una contaminación cruzada. Por otro lado, el productor independiente, poseía un galpón de igual manera carente de ventilación, lo que pudo inferir en los niveles de mohos encontrados.

De manera general, no solamente el almacenamiento determina el nivel de moho en granos de cacao sino también la cosecha, ya que la escogencia de mazorcas

enfermas introducidas en la masa a fermentar constituye un inóculo de mohos en los granos sanos. También, la frecuencia de remoción de los granos en la fermentación puede inducir la proliferación de mohos, pues al remover la masa con un máximo de dos remociones evita que los granos se aglomeren, así como también el desarrollo de mohos en la superficie y esquinas de los fermentadores y por tanto la colonización del los granos (Senanayake y col., 1997). El secado por su parte, puede estar involucrado en la proliferación de mohos. Secados excesivos pueden ocasionar grietas en el grano (Jinap y col, 1994), también la textura del piso así como la remoción de la masa y las altas temperaturas podrían inducir daños en la testa lo cual sería una entrada para la infestación del endospermo por los mohos (Ramos y col., 1993). Por lo tanto, se debe tener conciencia de buenas prácticas de manufactura, así como un conocimiento amplio en lo que corresponde a la agricultura, beneficio y almacenamiento del cacao, lo cual evitará la contaminación y el desarrollo de un producto de calidad e inocuidad garantizadas.

También, la incidencia de mohos en las muestras analizadas puede estar relacionada con su porcentaje de granos picados por insectos, granos partidos y mohosos señalados en la prueba de corte en la tabla número 3. Benítez (2003) indica que la ruptura de los granos, fracturas o daños debido a la acción de insectos, hacen al grano altamente susceptible al desarrollo fúngico.

El alto contenido de mohos presentados en las muestras del INIA I pudieron

ser un reflejo de esporas de mohos latentes adquiridas durante el proceso del beneficio del cacao, quedando inactivadas durante el almacenamiento de refrigeración. Sin embargo se deben colocar puntos de control en el recuento de mohos durante todo el proceso del beneficio y almacenamiento del cacao, a fin de determinar las entradas de mohos en el proceso y poder menguarlas a través de métodos combinados. Por ejemplo el posible uso de antimicrobianos naturales y la disminución de la temperatura en el almacenamiento del cacao.

Tabla 5. Niveles de mohos encontrados en granos de cacao almacenados en el INIA, Empresa y Productor independiente.

Procedencia	Log₁₀(UFC/g)*
INIA I	4,873 ± 0,012 a
INIA II	2,333 ± 0,246 b
INIAII Empresa	3,756 ± 1,357 c
Productor	5,235 ± 2,164 a

*Promedio de tres réplicas ± la desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas (p≤0,05). UFC indican unidades formadoras de colonias.

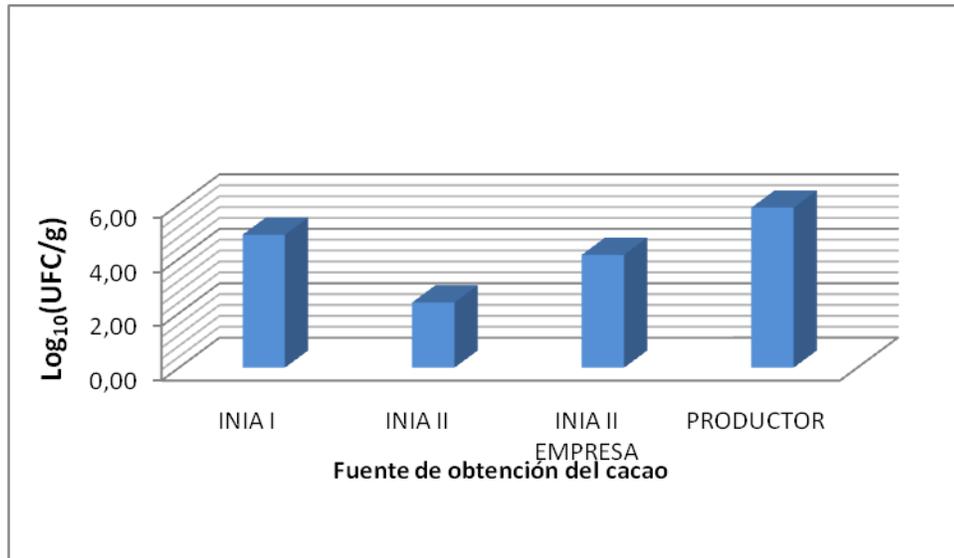


Figura 6. Niveles de mohos en granos beneficiados y almacenados por distintas fuentes.

3.4 PRINCIPALES ESPECIES DE MOHOS AISLADOS DE LOS GRANOS DE CACAO ANALIZADOS

En las muestras del INIA del primer lote se aislaron distintas especies de mohos tanto de la testa como del grano entero almacenado. En el grano entero, se observó solamente crecimiento de *Rhizopus sp.* Sin embargo, en la testa la variabilidad fue mayor lo cual se puede observar en la tabla 6. Se aislaron de la testa a *Cladosporium sphaerospermum*, con una incidencia de 65 %, *Geotricum candidum* con un 30 % y una especie no identificada por la clave utilizada, es decir sin importancia en alimentos con un 5 % (figura 7). Cabe recordar que los granos enteros, testa y endospermo fueron almacenados en refrigeración por cinco meses. Parámetro que pudo haber inducido en la variabilidad de mohos encontrados en cada parte del grano.

Tabla 6. Principales especies de mohos aislados de muestras de testa de granos de cacao, provenientes del lote I INIA (Moho total y % colonización).

MOHO	N° Cepas	PORCENTAJE (%)
<i>Cladosporium sphaerospermun</i>	13	65
<i>Geotricum candidum</i>	6	30
otros	1	5

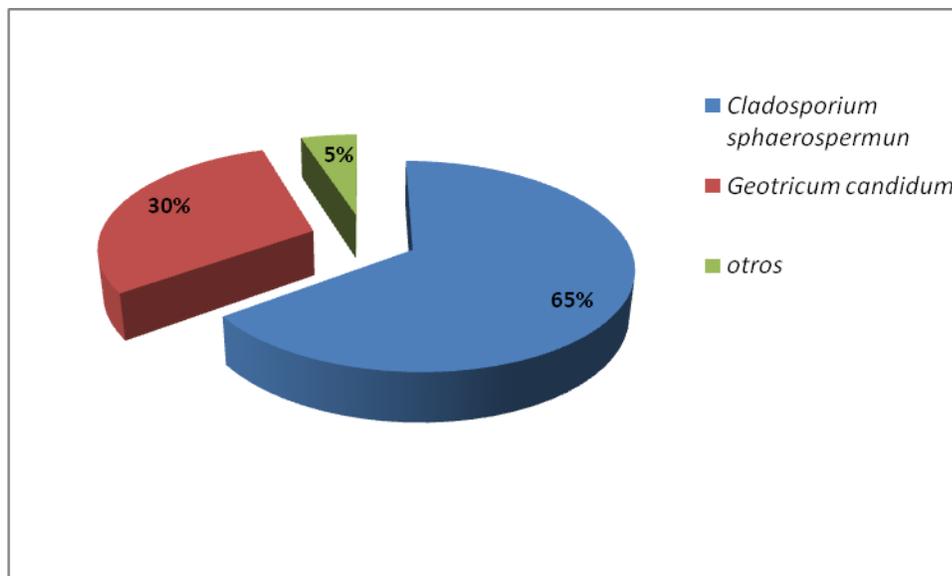


Figura 7. Principales especies de mohos aislados de muestras de testa de granos de cacao del Lote I INIA (Moho total y % colonización).

En las muestras beneficiadas y almacenadas por el INIA en el lote II, se realizó una identificación de mohos en las cuales aparecen especies presuntamente

micotoxigénicas. En la tabla 7, se indican las especies aisladas siendo la de mayor abundancia *G. candidum* (13 colonias) seguido por *Penicillium citrinum* (2 colonias) y *Aspergillus penicillioide* (1 colonia). *P. citrinum* según Samson, 1995 es productor de la micotoxina denominada citrinina. Dos colonias que no se pudieron identificar con la clave utilizada, por lo que se considera que no son de importancia alimentaria. En la figura 8, se representa el porcentaje de cada especie, siendo el 72, 22 % a *G. candidum*, 11,11 % *P. citrinum*, 11,11 % otras especies no identificadas, y un 5,55 % para *A. penicillioide*.

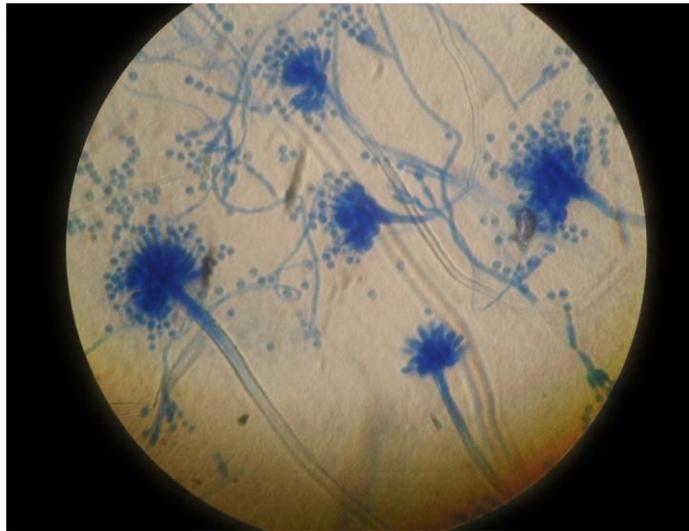


Figura 8. *Aspergillus penicillioide* visto al microscopio

Tabla 7. Principales especies de mohos aislados de muestras de granos de cacao, provenientes y almacenados del lote II INIA (Moho total y % colonización).

Moho	N cepa	Porcentaje
<i>Geotricum candidum</i>	13	72,22%
<i>Aspergillus penicillioide</i>	1	5,55%
<i>Penicillium citrinum</i>	2	11,11%
<i>Otros</i>	2	11,11%

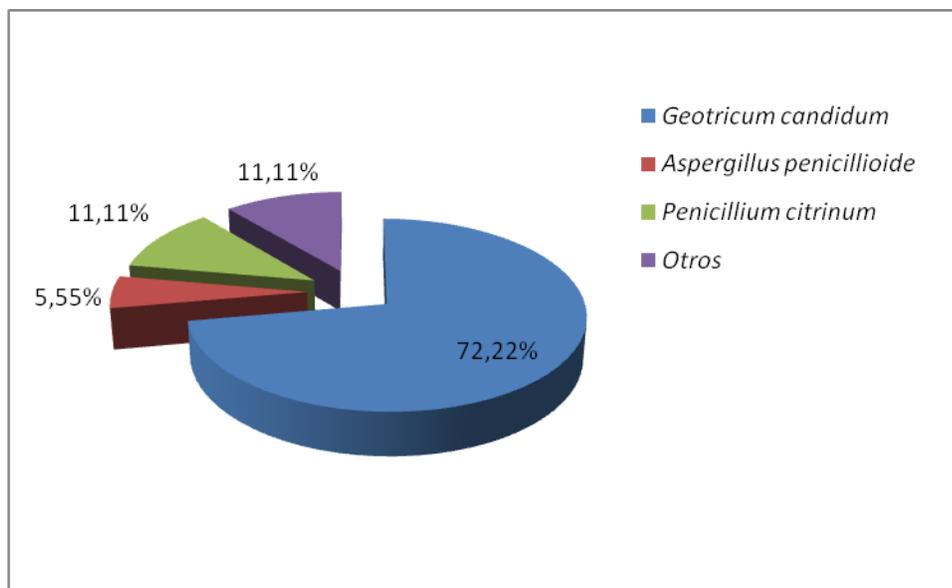


Figura 9. Principales especies mohos aislados de muestras de granos de cacao del Lote II INIA (Moho total y % colonización).

En las muestras beneficiadas por el INIA en su lote II y almacenadas por la Empresa, se identificaron las especies señaladas en la tabla 8. Siendo la de mayor incidencia *Rhizopus sp.* (567 colonias), *G. candidum* (4 colonias), *C. sphaerospermum* (1 colonia), *P. citrinum* (1 colonia) y 2 colonias no identificadas, los porcentajes se muestran en la figura 11, los cuales corresponden a 98,61 %; 0,70 %; 0,17 %; 0,17 y 0,35; % respectivamente.



Figura 10. *Penicillium citrinum* visto al microscopio.

Tabla 8. Principales especies de mohos aislados de muestras del lote II INIA y almacenados en una empresa (Moho total y % colonización)

Moho	Nº cepa	Porcentaje (%)
<i>Rhizopus sp</i>	567	98,61%
<i>Penicilium citrinum</i>	1	0,17%
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1	0,17%
<i>Geotricum candidum</i>	4	0,70%
Otros	2	0,35%

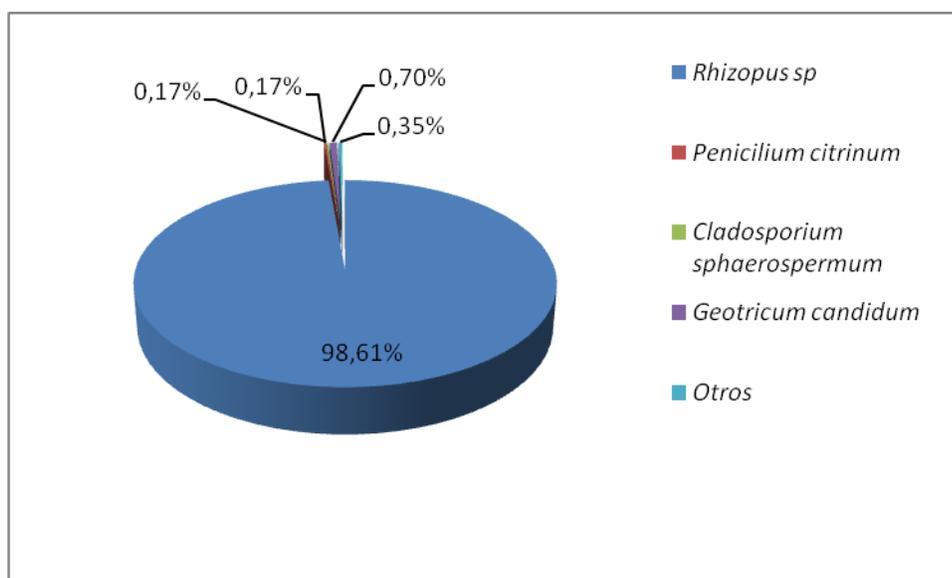


Figura 11. Principales especies de mohos aislados de muestras del lote II INIA y almacenados en una empresa (Moho total y % colonización).

En la tabla 9, se observan las especies de mohos identificadas en las muestras donadas por el Productor. Se identificó a *Rhizopus sp* (899 colonias), *G. candidum* (133), *Absidia corymbifera* (66 colonias), *C. sphaerospermum* (40 colonias) y *Aspergillus fumigatus* (1 colonia). En la figura 13, se muestra el porcentaje de las diferentes especies de mohos, correspondiendo un 78,93 a *Rhizopus sp*, 11,68 a *G. candidum*, 5,79 a *A. corymbifera*, 3,51 a *C. sphaerospermum* y 0,09 a *A. fumigatus*. Esta última especie es identificada por Samson y col, 1995 como productora de micotoxinas tales como gliotoxina, verrucológena, fumitremorginas A y B, fumitoxina, triptoquivalina (Samson y col, 1995).



Figura 12. *Absidia corymbifera* vista al microscopio.

Tabla 9. Principales especies de mohos aislados de muestras beneficiadas y almacenadas por un Productor independiente-Miranda (Moho total y % colonización).

Moho	N cepas	Porcentaje
<i>Absidia corymbifera</i>	66	5,79%
<i>Rhizopus sp</i>	899	78,93%
<i>Geotricum candidum</i>	133	11,68%
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	40	3,51%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	0,09%

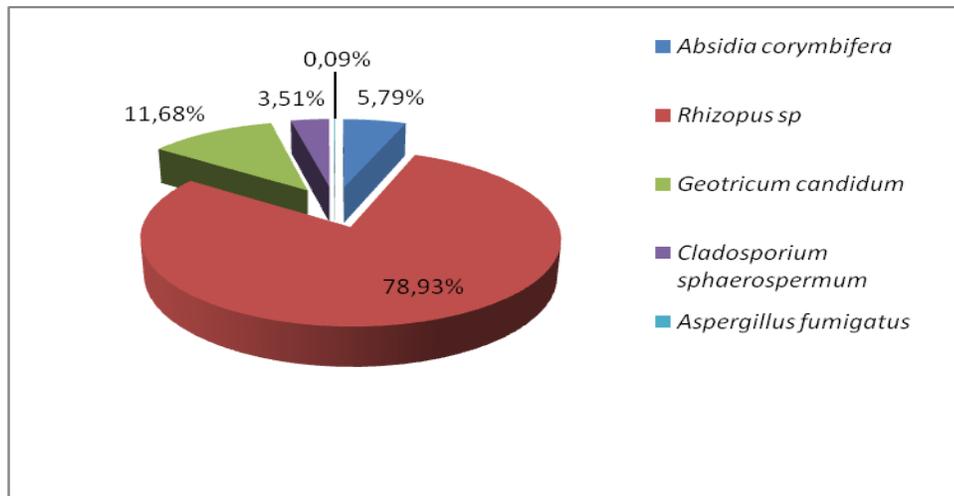


Figura 13. Principales especies de mohos aislados de muestras beneficiadas y almacenadas por un productor independiente-Miranda (Moho total y % colonización).

Como se mencionó en los antecedentes las especies predominantes en el cacao son aquellas pertenecientes a los *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Sánchez y col., 2008). De las cuales en el cacao estudiado se encontraron todas a excepción de *Mucor*.

La variabilidad de especies encontradas depende también de la época del año y el tipo de almacenamiento, pues Oyeniran, (1973) en Nigeria encontró 28 especies de mohos en nueve almacenes diferentes en los cuales 13 de las especies de mohos aisladas se encontraron independientemente de la época de año.

Estudios llevados a cabo por Ram, (1976) en Brasil determinaron hongos contaminantes de la testa y del endospermo. Encontrando como géneros predominantes a *Aspergillus*, *Penicillium* y *Syncephalastrum* en ambas partes. También, se encontraron otras especies pertenecientes a los géneros *Botryodiplodia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotricum*, y *Absidia*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio en cuanto a la incidencia de *Rhizopus*, *Geotricum* y *Absidia*.

Los estudios de Mazzani, 1983 en distintas regiones del país (Táchira, Miranda, Apure y Mérida) reportaron la variabilidad de mohos en granos de cacao fermentado y corriente, siendo los de mayor importancia los del género *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* y las especies *Scolecobasidium humícola* y *Eusotium chevalieri*. También, este investigador concluyó que independientemente del beneficio dado al cacao y del lugar de origen, la presencia de

mohos se hace destacar, lo cual revela grandes deficiencias en el almacenamiento ya que favorecen la proliferación de hongos, debido a que el 100 % de las almendras se encontraron con mohos a pesar de que las muestras presentaron menor de 8 % de humedad. En este mismo orden de ideas, Jinap y col, en 1994 reportan que el contenido de humedad en granos de cacao debería estar comprendido entre el rango de 7 a 8 % para evitar por ende el crecimiento de mohos.

No obstante, los resultados obtenidos por Mazzani, (1983) coinciden con los obtenidos en este estudio ya que la humedad de los granos de cacao utilizados en esta investigación están en el rango establecido por la norma COVENIN (< 8 %), debido a que las muestras estudiadas en esta investigación (INIA lote I y II, Empresa y Productor), se encontraron contenidos de humedad entre 7-8 % (tabla 2). Por lo que las condiciones de almacenamiento así como el tipo de beneficio podrían estar muy relacionadas con el crecimiento de los mohos encontrados y no la humedad de estos granos. Sin embargo, a pesar de lo señalado por Mazzani, (1983) existen otros factores que propician el crecimiento de los mohos tales como, el picado de la mazorca, granos partidos, remoción de los granos en el secado y la selección de granos sanos.

En granos de cacao almacenados *Mucor sp* y *Rhizopus stolonifer* son los más frecuentes según Wilbaux, 1965; Barbosa, 1968; Ram 1976 y Mazzani, 1983. Esta afirmación, Concuerda con los resultados encontrados en las muestras provenientes

del INIA I, productor y empresa, en cuanto al moho *Rhizopus sp.*

De las muestras del INIA II almacenadas en esa institución y en la empresa, se observan que *Geotricum candidum* y *Penicilium citrinum* son comunes a los dos almacenamientos, mientras que la aparición de *Aspergillus penicillioide*, *Rhizopus sp* y *Cladosporium sphaerospermum* varía con el tipo de almacenamiento dado por la Empresa y el Instituto.

Absidia corymbifera y *A. fumigatus* son característicos del almacenamiento dado por el Productor y su beneficio.



Figura 14. *Aspergillus fumigatus* visto al microscopio

De las siete especies de mohos aisladas en todas las muestras, tres especies parecen diferir con el tipo de almacenamiento, estas son *A. fumigatus*, *Absidia corymbifera* y *A. penicillioide*.

La especie *Rhizopus sp* fue la más abundante en todas las muestras, con excepción de las muestras almacenadas en el INIA en su segundo lote, quienes presentaron los niveles de moho total más bajos.

La muestra del lote I del INIA fue la única muestra almacenada en refrigeración, en la cual solo creció una especie de moho (*Rhizopus sp*). Al comparar esta muestra con las muestras que no fueron almacenadas en refrigeración (INIA II, Empresa y Productor), las cuales presentaron un número mayor de mohos diferentes, esto podría indicar que el número de especies de moho decrece con la disminución de la temperatura, siendo *Rhizopus sp* la más resistente a temperaturas bajas en las muestras de cacao. Sin embargo, esto necesita un mayor estudio para lograr una certera conclusión.

3.5 PORCENTAJE DE INFESTACIÓN DE LOS MOHOS EN LOS GRANOS DE CACAO EVALUADOS

Los granos de cacao del Lote I INIA almacenados en el INIA por cinco meses mostraron 100% de granos infestados por la especie *Rhizopus sp*. Por otro lado los granos de cacao del Lote II del INIA almacenados en dicha institución por dos meses, mostraron 2% de infestación por el moho *Rhizopus sp*. Para los granos beneficiados por el INIA del Lote II y almacenados en la Empresa por dos meses, mostraron un 100% de infestación, siendo el 92% por *Rhizopus sp* y el 8% por *Geotricum candidum*. Los granos beneficiados y almacenados por un Productor independiente por dos meses, mostraron también 100% de infestación. Correspondiendo 100% de

granos infestados por *Rhizopus sp* y un 84% de los granos por *Absidia corymbifera*.

De todas las especies identificadas en el grado de colonización, *Rhizopus sp* es la más común y la que presenta mayor porcentaje de infestación en todas las muestras, lo que hace de esta especie un organismos muy importante ya que podría estar relacionado con la pérdida de calidad del grano de cacao. Por otro lado, en la muestra del productor, *Absidia corymbifera* pudo alcanzar un alto porcentaje de infestación en los granos. Este moho vive en los más diversos sustratos, así como en muros humedecidos produciendo gran cantidad de esporas que se suspenden en el aire e invaden prácticamente todos los ambientes a donde se desplaza el hombre (López-Martínez, 2005). Por lo que se deberían emplear medidas para el control del crecimiento de todas las especies de mohos aisladas de los granos, ya que los mohos son productores de enzimas lipolíticas. En especial la especie lipolítica *Rhizopus sp* utilizada en la industria en la producción de aceites (Rivera y García, 2007). Por ende esto podría afectar el porcentaje de grasa y la acidez del cacao.



Figura 15. Granos de cacao infestados por mohos

4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD TOXIGÉNICA DE LAS VARIETADES DE MOHOS AISLADAS

El resultado de los mohos analizados de todas las fuentes (INIA Lote I y II, almacenado en la Empresa y Productor independiente), trajo consigo el aislamiento de siete especies representativas, siendo estas *Rhizopus sp*, *Cladosporium pshaerospermum*, *Geotricum candidum*, *Absidia corymbifera*, *Penicillium citrinium*, *Aspergillus penicillioide* y *Aspergillus fumigatus*. Estas especies fueron sometidas a cromatografía de capa fina con diferentes solventes para la extracción cualitativa de las micotoxinas.

Al analizar la cromatografía no se observó corrida aparente a simple vista de algún compuesto extraído de los puntos. Sin embargo al someter a las placas bajo luz UV se

observaron distintos Rf fluorescente, lo que podría significar producción de micotoxinas. No obstante, al comparar los Rf calculados en los tres solventes distintos, ninguno coincidió con las micotoxinas de referencias propuestas por Samson y col, 1995. Lo que indicó que las especies de mohos evaluadas no originaron micotoxinas.

De las siete especies aisladas e identificadas solo dos son señaladas como micotóxicas (*P. citrinum* y *A. fumigatus*) por Samson y col, (1995). Sin embargo en el análisis cromatográfico no resultaron serlo. Esto pueden deberse a que la toxicidad de una especie depende de las características de la cepa individual y de las condiciones medioambientales.

La posibilidad de sintetizar alguna micotoxina no depende solamente de la especie del moho sino también de la cepa en particular (López, 2004). Martínez en 1991 citado por López, 2004 indica que esta capacidad de producir micotoxinas depende del sustrato en el que fueron aislados así como también del área geográfica y la época del año.

Un estudio realizado por Martínez, (1986) comprueba que la producción de micotoxinas depende de la cepa en particular, él analizó 41 cepas de *A.flavus* aisladas de maíz encontrando que tan solo el 39 % de estas resultaron ser productoras de aflatoxinas.

La micotoxina llamada citrinina es producida por *P. citrinum* y otros hongos. Los organismos productores de citrinina se encuentran en los granos de café y cacao. Sin embargo, la micotoxina, lo mismo que otras, no se encuentra hasta el grado de crecimiento. Buchanan y col., (1983) concluyen, que la razón aparente de este hecho se debe a la inhibición de la citrinina en *P. citrinum* por la cafeína presente en el cacao y el café. Éste autor comenta que la inhibición ocasionada por la cafeína es muy específica ya que se produce también una disminución en el crecimiento de los organismos.

Jay (2002), indica que puede haber crecimiento de mohos sin producción de micotoxinas y que los parámetros máximos y mínimos que regulan el crecimiento y la producción de toxinas no son difíciles de definir, debido a la variabilidad de hábitats en la naturaleza.

Afianzados en los resultados obtenidos se puede decir que las cepas de las especies de mohos aisladas y evaluadas no son toxigenicas.

5. EVALUCIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DEL TIMOL.

Diferentes extractos de plantas han sido aceptados para ser usados como fungicidas, ya que su análisis químico y evaluación farmacológica han demostrado que contienen un principio especial, el cual está asociado a metabolitos secundarios (Zapata y col., 2003). Entre los metabolitos secundarios se encuentra el timol el cual pertenece al grupo de los terpenos. El timol es el componente mayoritario del aceite

esencial de tomillo de la planta *Thymus vulgaris* L, está legalmente registrado como saborizante o productos alimenticios tanto en la Unión Europea como en los Estados Unidos (Zhou y col., 2007). Este compuesto exhibe un fuerte efecto antibacteriano, pero su aplicación en alimentos ha sido limitada debido a su fuerte sabor y olor.

5.1 EN AGAR EMA SOBRE LAS SIETE CEPAS AISLADAS.

El crecimiento de los mohos (*Rhizopus sp*, *Cladosporium pshaerospermum*, *Geotricum candidum*, *Absidia corymbifera*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus penicillioide* y *Aspergillus fumigatus*) en el agar EMA desprovisto del timol (control) se dio con normalidad. Sin embargo, en el agar EMA, suplementado con timol, cuyas concentraciones de timol eran de 500, 1000 y 5000 ppm, no se observó crecimiento radial alguno de los hongos, es decir, se observó una inhibición completa en el desarrollo de los mohos durante los 30 días de tratamiento.

Estudios realizados por Rasooli y Owlia, (2005), indicaron la fuerte actividad antifúngica del aceite esencial de timol proveniente de la planta *Thymus vulgaris* L al emplear entre 1,60 y 50,20 µg/mL sobre el moho *Aspegillus parasíticus*. Además estos mismos investigadores, probaron el efecto del aceite esencial de timol provenientes de dos plantas *Thymus eriocalyx* y *Thymus porlock*, las cuales tenían mayor proporción de timol que otros componentes. Encontrando que ambas plantas tenían un alto poder fungistático a concentraciones de 250 ppm y fungicida a concentraciones de 500 ppm sobre la especie aflatoxigénica *Aspegillus parasíticus*.

S̃ egvic' Klaric y col., 2006 comentan los trabajos de Sokeman y col., 2004 el cual puso a prueba el aceite esencial de la planta *Thymus spathulifolius* la cual contenía 36,5 % de timol. Concluyó que el aceite esencial frenó el desarrollo de *Trichophyton spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Alternaria spp.* y *Aspergillus spp.*; Con un rango en la mínima concentración inhibitoria de 31 a 250 µg/mL.

Los estudios de S̃ egvic' Klaric y col., 2006 determinaron que el timol puro en EMA poseía una mínima concentración inhibitoria sobre las especies evaluadas entre 1.60 y 6,72 µg/mL. La especie más sensible fue *Cladosporium globosum*, mientras que la más resistente fueron las especies pertenecientes a *Mucor*. También, evaluaron el efecto del aceite esencial de timol y encontraron concentraciones mínimas inhibitorias por debajo de 20µg/mL. Concluyeron, que el aceite puro de timol es tres veces más inhibitorio que el aceite esencial de la planta, atribuyendo el efecto antifúngico del aceite esencial de la planta al timol o al sinergismo entre los distintos componentes del aceite. Las especies evaluadas e inhibidas por estos investigadores fueron las pertenecientes a los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* y *Mucor*. Estos autores, también demostraron el efecto antifúngico y fungistático del aceite esencial de timol en fase de vapor en concentraciones efectivas de 82 µg/L, siendo efectivo durante 60 días de tratamiento, incluso sobre las esporas. Mahmoud, (1994) observó que el timol tenía un efecto antifúngico y antiaflatoxigénico sobre *A. flavus*, a una concentración de 250 ppm.

Por otro lado, Alzate y col, (2009), demostraron que el timol a 125 mg/ L y el citral a 300 mg/L presentaron un efecto significativo, ya que no permitieron el desarrollo micelial del hongo (*Colletrotrichum acutatum*) e inhibieron completamente la esporulación y la germinación de las esporas. Los resultados obtenidos con timol coinciden con la publicación de Hernández y col., (2003); quienes reportan que este compuesto inhibió totalmente el crecimiento micelial de los hongos *Microsporum canis* y *Trichophyllum mentagrophytes* a 100 mg/L y de *T. rubrum* a 50 mg/L. Bravo y col., 2000 encontraron que el timol inhibe en un 100% el desarrollo micelial del hongo fitopatógeno *Fusarium moniliforme*.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios antes mencionados, concuerdan con los resultados arrojados en esta investigación, aunque hay que acotar que no se utilizó una concentración de 250 ppm sino mayores a esta.

5.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL TIMOL, ROCIADO POR ASPERSIÓN, SOBRE LOS MOHOS PRESENTES EN LOS GRANOS DE CACAO FERMENTADO, SECADOS AL SOL Y ALMACENADOS POR DOS MESES POR UN PRODUCTOR

A LOS SEIS DÍAS DE ALMACENAMIENTO

Hubo un efecto notorio del poder antifúngico del timol sobre los granos de cacao. Se observó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el grupo control y los granos de cacao sometidos a tratamiento, tanto para el conteo de mohos después de los 6 y 25 días de almacenamiento. Se detalla en la tabla 10, que a los seis

días de almacenamiento comparando los tratamientos con el control, que hay casi una reducción alrededor de dos unidades logarítmicas formadoras de colonias de moho por gramos de cacao. Es de notar, que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, es decir, no varía el nivel de mohos con respecto a la concentración del timol en cacao utilizada.

Tabla 10. Niveles de mohos a los 6 días de almacenamiento con las distintas concentraciones de timol en granos de cacao.

Tratamiento con timol (ppm). 6 días	Log₁₀(UFC/g)*
0	4,267 ± 0,02 a
250	2,398 ± 0,02 b
500	2,477 ± 0,24 b
1000	2,301 ± 0,11 b

*Promedio de tres réplicas ± la desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). UFC indican unidades formadoras de colonias.

En la tabla 11, se observan las principales especies de mohos aisladas a los seis días de tratamiento con timol. Para el control, se aislaron a *Rhizopus sp* (232 colonias), *C sphaerospermum* (34 colonias), *G. candidum* (7 colonias) y otras especies no identificadas (5colonias). A la concentración de 250 y 500 ppm se aislaron dos especies identificadas *C sphaerospermum*, *G. candidum*. A la concentración de 1000 ppm se aisló 3 colonias de *C sphaerospermum* y una colonia no identificada. En la figura 16, se observan los porcentajes de cada especie de moho por tratamiento aplicado. Si se comparan los tratamientos con el grupo control se

detalla que la especie *Rhizopus* sp. no aparece cuando se aplican los tratamientos, a pesar de ser la más abundante en el control. Así como también que a concentración de 1000 ppm de timol, la especie *G. candidum* no se desarrolla.

Tabla 11. Principales especies aisladas de mohos después de los seis días de almacenamiento con el tratamiento por aspersión con timol.

Tratamiento con timol	Moho	N de Cepas	Porcentaje
0 ppm	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	34	12,23%
	<i>Geotricum candidum</i>	7	2,52%
	<i>Rhizopus sp</i>	232	83,45%
	Otros	5	1,80%
250ppm	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	80%
	<i>Geotricum candidum</i>	1	20%
500ppm	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	40%
	<i>Geotricum candidum</i>	1	20%
	otros	2	40%
1000ppm	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	75%
	otros	1	25%

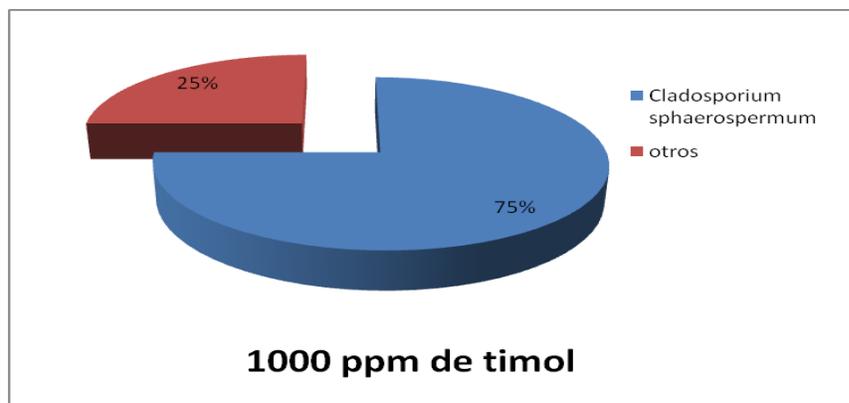
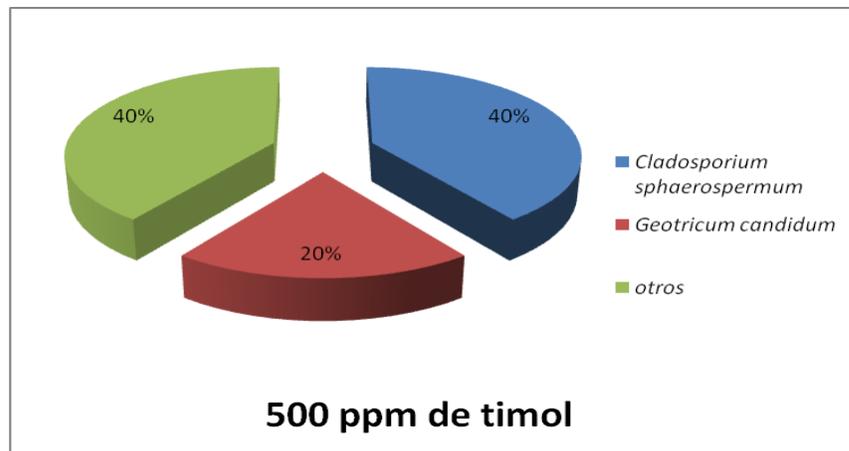
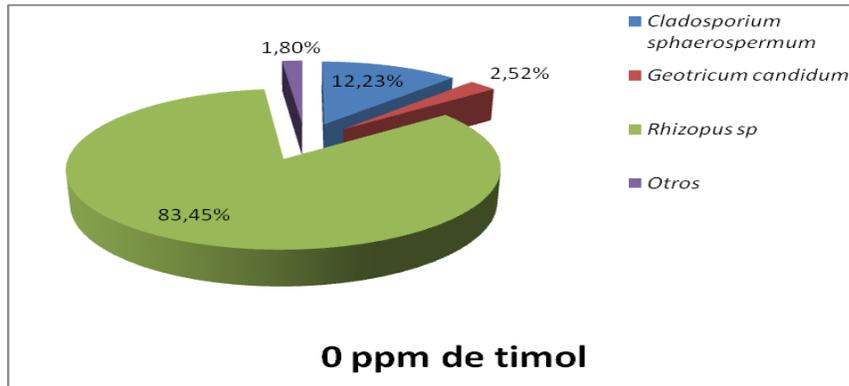


Figura 16. Principales especies de mohos aislados de muestras almacenadas por un Productor y realmacenadas con tratamiento con timol por seis días (Moho total y % colonización).

A LOS VEINTICINCO DÍAS DE ALMACENAMIENTO

Por otro lado en la tabla 12 se muestran los niveles de mohos encontrados en los granos de cacao después de haber aplicado el tratamiento con timol y almacenados por 25 días. Se observa que los niveles de mohos encontrados están alrededor de dos unidades logarítmicas. Existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el control y los tratamientos aplicados. Sin embargo a diferencia del tratamiento por seis días, en los 25 días se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre dos concentraciones de timol. No hay diferencias estadísticas en los resultados obtenidos al utilizar 250 y 500 ppm de timol, o 250 y 100 ppm de timol. Pero si hay diferencias en utilizar 500 ppm y 1000 ppm. Siendo la concentración más efectiva aquella que logró una disminución mayor en los niveles de mohos en el grano de cacao aspergido con el timol. La concentración de timol más efectiva fue la de 500 ppm, seguido de 250 ppm y por último la menos efectiva fue la de 1000 ppm de timol.

Tabla 12. Niveles de mohos a los 25 días de almacenamiento con las distintas concentraciones de timol en granos de cacao.

Tratamiento con timol (ppm). 25 días	Log₁₀(UFC/g)*
0	5,326 ± 0,00 a
250	2,176 ± 0,05 bc
500	2 ± 0,00 b
1000	2,397 ± 0,02 c

*Promedio de tres réplicas ± la desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). UFC indican unidades formadoras de colonias

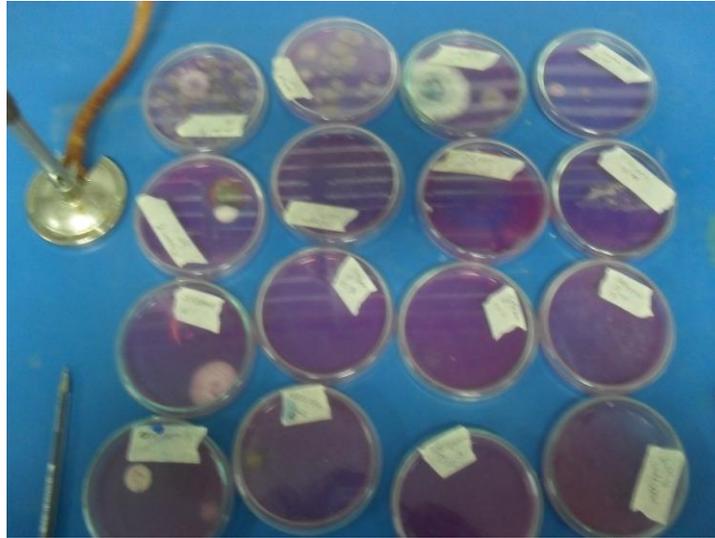


Figura 17. Placas de agar DRBC mostrando el conteo de mohos realizado a los granos de cacao después de 25 días de haber aplicado el tratamiento con timol y el control.

En cuanto a la identificación de especies a los 25 días de haber aplicado el tratamiento a los granos de cacao se diferencian cuatro especies en el control y una especie no identificada. Siendo la más abundante *Rhizopus sp* (384 colonias), *G. candidum* (7), *P. citrinum* y *C. sphaerospermum* (1 colonia respectivamente). Se observa al igual que en el tratamiento por seis días que la especie *Rhizopus sp* no se aísla en los 25 días con las distintas concentraciones con timol. Sucede lo mismo con *P. citrinum*, pues no se identifica colonia alguna de esta especie al aplicar el timol. Las especies *G. candidum* y *C. sphaerospermum* se pudieron identificar en todos los tratamientos aplicados pero en menor medida comparándolo con el control. Esto se observa en la tabla 13. En la figura 18 se presentan los porcentajes de cada especie aislada en los granos analizados.

Tabla 13. Principales especies aisladas de mohos después de los 25 días de almacenamiento con el tratamiento por aspersión con timol.

Tratamiento con timol	Moho	Nº de Cepas	Porcentaje
0 ppm	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1	0,25%
	<i>Geotricum candidum</i>	7	1,77%
	<i>Rhizopus sp</i>	384	97,22%
	<i>Penicillium citrinum</i>	1	0,25%
	otros	2	0,51%
250ppm	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1	33,33%
	<i>Geotricum candidum</i>	1	33,33%
	otros	1	33,33%
500ppm	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1	50%
	<i>Geotricum candidum</i>	1	50%
1000ppm	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	40%
	<i>Geotricum candidum</i>	1	20%
	otros	2	40%

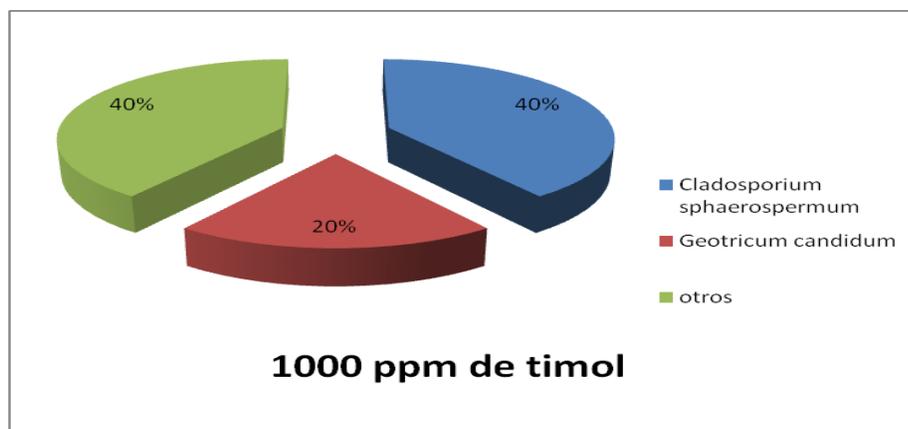
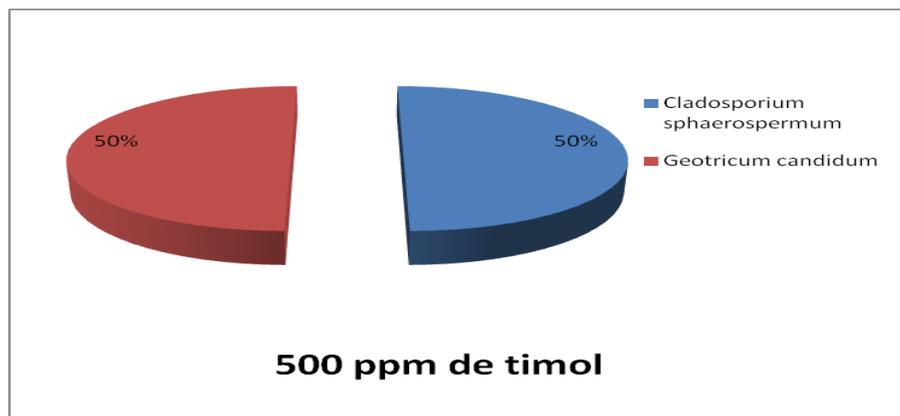
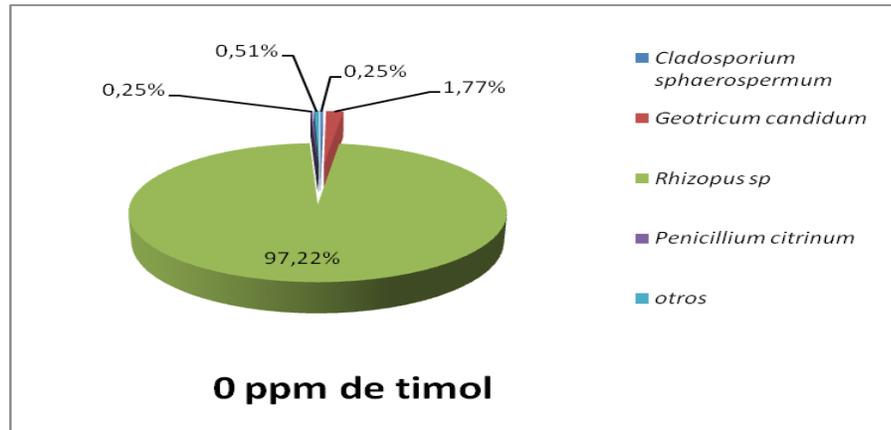


Figura 18. Principales especies de mohos aislados de muestras almacenadas por un Productor y realmacenadas con tratamiento con timol por 30 días (Moho total y % colonización).

Estudios en granos en almacén de los de aceites esenciales como fungicida han sido desarrollados por Paster y col., (1994) reportaron concentraciones inhibitorias de los aceites esenciales de orégano y tomillo. Siendo de 2ml/L la concentración mínima inhibitoria del orégano para lograr una inhibición en el crecimiento micelial de los hongos. Las esporas necesitaron una concentración de 2-2,5 ml/L para ser eliminada. Por otro lado el aceite esencial de tomillo no fue muy eficiente, ya que según indican los autores, hubo crecimiento micelial hasta con exposición de 4 ml/L de timol.

En la figura 19 se observan los niveles de mohos a los tiempo 6 y 25 días de almacenamiento. Si se comparan los niveles aplicado el tratamiento, se observa que se mantienen casi iguales en el tiempo, alrededor de $2 \log_{10}$ UFC/g unidades logarítmicas formadoras de colonia por gramo. Esto indica que el poder del timol es antifúngico y fungistático, pues no solo inhibe el crecimiento de los mohos presentes en los granos de cacao sino que también los elimina.

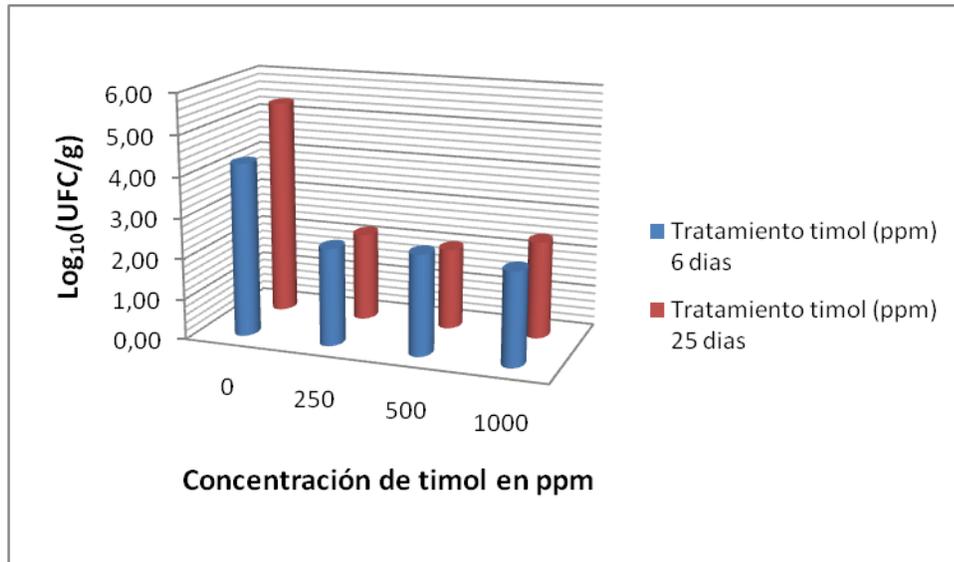


Figura 19. Comparación del efecto del timol a los 6 y 25 días de almacenamiento del grano de cacao

La actividad observada del timol puede ser atribuida a daños letales sobre la célula fúngica, ya que se alteran la capacidad reproductiva y germinativa; sin embargo, no se cuenta con la información adecuada que posibilite determinar el sitio o sistemas biológicos afectados por estos materiales.

Se evaluó la presencia de los mohos totales presentes en el control (granos sin timol) a los seis días y los granos tratados con timol. Se encontró que las concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm tuvieron un efecto fungicida sobre los mohos presentes en los granos, causando una reducción del 44; 42,92 y 46, 13 % respectivamente.

Cuando el almacenamiento se realizó durante 25 días, se observó que la reducción de los mohos presentes en el grano de cacao fue de 48,95, 53,16; y 44% a

las concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm respectivamente (tabla 14).

Tabla 14. Porcentaje fungicida de los mohos aspergidos por timol para un almacenamiento de 6 y 25 días.

Tratamiento de timol (ppm)	% de inhibición a los 6 días	% de inhibición a los 25 días
250	44	48,95
500	41,92	53,16
1000	46,13	44

Se observa que los porcentajes fungicidas a los 25 días son mayores (excepto para los 1000 ppm) comparados con los encontrados para los seis días. Esto podría indicar que el porcentaje fungicida del timol a concentraciones de 250 y 500 ppm aumenta con el tiempo de exposición sobre los granos de cacao. Sin embargo esto necesita un estudio más seguido con respecto del conteo de moho en el tiempo en los granos de cacao con las concentraciones de timol aspergidas (250 y 500 ppm) sobre los granos de cacao en almacenamiento. Por otro lado, el porcentaje fungicida de la concentración de timol de 1000 ppm a los 25 días disminuye comparándola con el porcentaje a los 6 días. Pudiendo indicar esto que para un almacenamiento de los granos de cacao por seis días es recomendable utilizar concentraciones de 1000ppm mientras que para un almacenamiento mayor en el tiempo por 25 días, se recomienda utilizar concentraciones de 500 ppm.

El resultado obtenido para la concentración de 1000 ppm, concuerdan con los obtenidos por Alzate y col., 2009. Ellos observaron que el timol a concentraciones de 100, 150 y 200 mg/L y el AE de *T. vulgaris* a 350 mg/L muestran una tendencia descendente más pronunciada con el paso del tiempo, indicando que el efecto inhibitorio que puede ser alcanzado con estos compuestos disminuye ostensiblemente y es muy significativo después de 72 horas. Sin embargo esto no se cumplió para las concentraciones de 250 y 500 ppm de timol utilizadas en este estudio, pues estas aumentaron al finalizar los 25 días.

No se encontraron estudios realizados con timol sobre el cacao en almacenamiento, por lo que se debería aumentar la cantidad de cacao almacenado y observar si son efectivas las concentraciones de timol en grandes cantidades de granos de cacao en almacenamiento.

La acción antimicrobiana del timol en el cacao está ayudada por parámetros como el pH ácido de los granos de cacao. Esto debido a que a pH bajos la molécula de timol se encuentra en su mayoría sin disociar por lo cual es más hidrofóbica y puede unirse por tanto a regiones hidrofóbicas de las proteínas de las membranas así como también disolverse con mayor facilidad en la fase lipídica de la membrana plasmática (Juven y col, 1994)

Cabe destacar que estos estudios son los pioneros en la utilización del antimicrobiano natural de timol en granos de cacao. Pudiéndose dirigir los estudios

en la inhibición de mohos en cacao hacia la combinación de tecnologías de barreras, tales como la disminución de la temperatura y la variación de la concentración de timol. También se debe realizar estudios en el efecto del timol en las propiedades sensoriales del cacao y sus productos.

CONCLUSIONES

Los índices de fermentación más altos correspondieron para las muestras del INIA I, II y empresa (79, 80, 78 %). La muestra del productor presentó los índices más altos de granos planos y partidos (16 %). el porcentaje más alto de granos dañados por insectos fue para la empresa y el productor (5 y 2 % respectivamente). Los porcentajes más altos de granos mohosos fueron para las muestras del INIA I y el productor (4 %). Lo cual coincide en los análisis microbiológico de mohos totales siendo para estas muestras los más altos (4,87 y 5,24 log₁₀ (UFC/g) respectivamente).

El almacenamiento dado al lote II de granos de cacao por la empresa y el INIA II afectó solamente el contenido proteico. Sin variación alguna en el resto de los componentes del análisis proximal.

Las muestras de granos de cacao que presentaron el mayor recuento de mohos totales fueron las tratadas por el productor (5,24 log₁₀ UFC/g), seguida por las del INIA I (4,87 log₁₀ UFC/g) almacenadas por cinco meses, y las muestras de la empresa y del INIA II que presentaron un recuento de 3,76 log₁₀ UFC/g y 2,33 log₁₀ UFC/g respectivamente.

Se aislaron una totalidad de siete especies en las muestras de granos de cacao beneficiadas y almacenadas por el INIA (lote I y II), un productor y una empresa. Siendo estas *Rhizopus sp*, *Cladosporium pshaerospermum*, *Geotricum candidum*,

Absidia corymbifera, *Penicillium citrinium*, *Aspergillus penicillioide* y *Aspergillus fumigatus*.

La especie *Rhizopus sp* fue la más abundante en todas las muestras, con excepción de las muestras almacenadas en el INIA en su segundo lote, quienes presentaron los niveles de moho total más bajos.

De las siete especies de mohos aisladas en todas las muestras, tres especies difieren con el tipo de almacenamiento, estas son *A. fumigatus*, *Absidia corymbifera* y *A. penicillioide*.

Las siete cepas de las especies de mohos aisladas y evaluadas no mostraron capacidad toxinogénicas en agar EMA.

Se encontró total inhibición del crecimiento radial de las siete especies aisladas en agar EMA tratadas con diferentes concentraciones del aceite esencial de timol (500, 1000 y 5000 ppm), durante los 30 días de tratamiento.

No existen diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos de timol aplicados durante seis días sobre los granos de cacao almacenados, para inhibir los mohos presentes en el grano.

Los porcentajes fungicidas del timol alcanzado después de los 6 días de almacenamiento a las concentraciones de 250, 500 y 100 ppm fueron: 44; 41,92 y 46,13

% respectivamente.

Las especies *Rhizopus* sp y *P. citrinum* quedaron totalmente inhibidas en el tratamiento con timol con las tres concentraciones aplicadas y los dos tiempo de tratamiento a los 6 y 25 días, sobre los granos de cacao.

No hay diferencias estadísticas en los resultados de mohos obtenidos al utilizar 250 y 500 ppm de timol, o 250 y 1000 ppm de timol. Pero si hay diferencias al utilizar 500 ppm y 1000 ppm durante 25 días de tratamiento sobre los granos de cacao.

Los niveles de mohos encontrados en el cacao durante el tratamiento con timol por 6 y 25 días permanecieron casi iguales en el tiempo, alrededor de $2 \log_{10} \text{UFC/g}$. Lo que indica que las concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm de timol tienen un efecto antifúngico y fungistático sobre los granos de cacao almacenados.

Las concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm de timol mostraron un porcentaje fungicida de 48,95; 53,16 y 44 % sobre granos de cacao rociados por aspersión y almacenados durante 25 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aballa, A. and Rosen, J. P. (2001). The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings, *European Food Research and Technology*. 212: 551-560.
- Acosta, R., Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., Parra, P. y Trujillo de Leal, A. (2001). Estudio de algunas características físicas y químicas de la grasa de los cotiledones de tres tipos de cacao de la localidad de Cumboto. *Agronomía Tropical* 51(1):119-131.
- Álvarez, C. (1998). Caracterización física, química y fisicoquímica de granos tostados de cacao (*Theobroma cacao* L.) cosechados en tres zonas del estado Aragua: Chuao, Cuyagua y Cumboto. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
- Álvarez, C., Pérez, E., y Lares, M. (2007). Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, Estado Aragua. *Agronomía Trop.* 57(4):249-256.
- Álvarez, C., Tovar, L., García, H., Morillo, F., Sánchez, P., Girón, C., y De Farias A. (2010). Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) usando dos tipos de fermentadores. *Revista Científica UDO Agrícola*. (10)1: 1-12.

- Alzate O., Diego A.; Mier M., Gonzalo I.; Afanador K., Lucía; Durango R., Diego L.; García P., Carlos M. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antigúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. Vitae, vol. 16, núm. 1, pp. 116-125 [Sitio en internet] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=169815643014>. Consultado: 04 de febrero de 2012.
- Anmad, S. y Branen, A. L. (1981). Inhibition of mold growth by butylated hidroxyanisole. J. Food Sci. 46: 1059-1063.
- Al-Khayat, M. A. y Blank, G. (1985). Phenolic spice components sporostatics to *Bacillus subtilis*. J. Food Sci. 50: 971-974, 980.
- Anton, A.; Lisazo, J. (2001). Hongos y micotoxinas. Fundación Iberica para la Seguridad alimentaria.
- Azzous, M. A. y Bullerman, L. B. (1982). Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components an comercial antifungal agents. J. Food Protection. 45: 1298-1301.
- Barbosa, M A, de F. (1968). Aspets of mycological inspection of stored products, with special reference to peanuts and cocoa beans. García de Orta 16: 23-29

- Basílico, M.Z. y Basílico, J.C. (1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. The Society for Applied Microbiology. Facultad de Ingeniería química. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- Bekele, F. y J. Bekele, (1996). A sampling of the phenetic diversity of cacao in the international cocoa Gene Bank of Trinidad. *Crop Sci.* 36: 57-64.
- Benitez, I. (2003). Relación entre las concentraciones de algunos metales (hierro, cobre, zinc) y el crecimiento de *Aspergillus flavus/parasiticus* y *Fusarium moniliforme* y la producción de aflatoxinas y fumonisinas en maíz. Trabajo Especial de Grado. Facultad de ciencias. Universidad Central de Venezuela.
- Bravo LL, Bermúdez TK, Montes-Belmont R. (2000). Inhibición del *Fusarium moniliforme* Sheld mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Manejo Integrado de Plagas.* 57: 29-34.
- Borboa-Flores, J.; Rueda-Puente, E. O.; Acedo-Félix, E.; Ponce, J. F.; M. Cruz-Villegas, J. García-Hernández, L. y Ortega-Nieblas, M. M (2010). Evaluation of antibacterial activity in vitro of essential oils vs *Clavibacter michiganensis* subespecie michiganensis] *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 539 – 547.
- Bogantes- Ledezma Pilar, Bogantes-Ledezma Diego, Bogantes- Ledezma Sixto. Aflatoxinas. *Acta méd. costarric* [revista en la Internet]. (2004) Oct

[citado 2011 Abr 07]; 46(4):174178. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00016002200400040004&lng=es.

- Bullerman, L. (1986). *Micotoxins and food safety. Scientific Status Summary.* Universidad de Nebraska. Lincoln.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Buchanan, R.L., M.A. Harry, and M.A. Gealt. (1983). Caffeine inhibition of sterigmatocystin, citrinin and patulin production. *J. Food Sci.* 48: 1226-1228.
- Braudeau, J. (1970). *El cacao. Técnicas Agrícolas y Producciones Tropicales.* Editorial Blume. Barcelona (España) p. 297.
- Braudeau, J. (1975). *El Cacao.* Editorial Blume. Barcelona-España. 292 p.
- Cha, D. y Chinnan, M. 2004. Biopolimer-based antimicrobial, packaging: A review. *Critical review in Food Science and Nutrition.* 44, 4; Health & medical complete pg 223.
- Christensen, C.M. (1978). Fungi and seed quality. *Outlook on Agriculture* 9 (5): 209-218.
- Clapperton, J. F. (1994). A review of research to identify the origins of cocoa flavor characteristics. *Cocoa Growers. Bulletin N° 48.*

- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. (1995). Norma Venezolana N° 50. Granos de cacao. Prueba del Corte (Segunda Revisión). Fondonorma, Caracas. Venezuela. 6 p.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. (1995). Norma Venezolana N° 1339 Granos de cacao. Toma de muestras (Primera Revisión). Fondonorma, Caracas. Venezuela. 5 p.
- Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Bulletin of the United States National Museum, Smithsonian Institution. Washington. 614 pp.
- El Khor, S. (2006). Evaluación de la composición química y microbiológica de los productos de la fermentación de almendras de cacao (*Theobroma cacao* L) fino aromático. Trabajo de post-grado. Facultad de Ciencias. Universidad central de Venezuela. Caracas Venezuela.
- Enríquez; G. (1985). Curso sobre el cultivo de cacao. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Turrialba. Costa Rica. 239 p.
- Fondo Nacional del cacao (FONCACA). (1998). Manual técnico del cultivo de cacao en Venezuela. Ministerio de Agricultura y Cría. Fondo de Investigaciones Agropecuarias, estación experimental de Miranda. Venezuela. 133p.

- Fuenmayor, M. (1991). Efectos de las trazas metálicas sobre la producción de aflatoxinas. Trabajo Especial de Grado. Instituto de Ciencias y tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
- González, F., Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L. y Monteverde-Penso, E. (1999). Influencia del índice de cosecha de la mazorca sobre algunas características de la grasa de dos cultivares de cacao (*Theobroma cacao L.*). Rev. Fac. Agron. (UCV) 25(2):159-171.
- Graziani, L; Ortiz, L; Angulo, J; Parra, P. (2002). Características físicas del fruto de cacaos tipos criollo, forastero y trinitario de la localidad de Cumboto, Venezuela. Agronomía Tropical. 52(3): 343-361.
- Guzmán, R. (2007). Evaluación de los cambios ocurridos durante el beneficio del cacao (*Theobroma cacao L.*) a través de parámetros morfoanatómicos, fisicoquímicos y nutricionales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
- Hernández L, Rodríguez JM, García D, Pino AJ. (2003). Actividad antidermatofítica in vitro de aceites esenciales. Rev Cubana Plant Med. 8 (2).[Sitio en internet]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8_2_03/pla04203.htm. Consultado: 03 de febrero de 2012.

- Jay, J. (2002). Microbiología moderna de los alimentos. 4ta edición. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza-España. Pág. 556.
- Jinap, S.; Thien, J.; Yap, T. (1994). Effect of drying on acidity and volatile fatty acids of cocoa beans. J.S.F.A. Vol. **65**: 67-75.
- Jones, R. K.; H. E. Duncan and P. B. Hamilton. (1981). Planting date, harvest and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *A. flavus* in field corns. Phytopathology 71:810-816.
- Juven, J. M., Kanner, J., Schved, F., y Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J. of Applied Bacteriology. 76: 626-631.
- Juven, B., Henis, Y. y Jacoby, B. (1972). Studies of the mechanism of the antimicrobial of ouleropein. J. of Applied Bacteriology. 35: 559-567.
- Kabara, J. J. (1991). Phenols and chelators. En: Food Preservatives. Ed. N. J. Russel and G. W. Gould. Blackie y Son Ltd. Glasgow.
- Kealey; Kirk. S; Rodney .M; Romanczyk. J; Leo. J; Hammerstone. J; John. F; Buck; Margaret. M; Cipolla; Giovanni. G, (2005). Alkalized cocoa solids. United States Patent 6: 887.
- Lares M. (2007) Diferenciación, caracterización y composición lipídica de la materia extraída del cacao en dos de los procesos postcosecha. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.

- Liendo, R. F., Padilla, F., and Quintana, A. (1997). Characterization of cocoa butter extracted from Criollo cultivars of *Theobroma cacao* L.. Food Research International 30(9):727-731.
- López, A. (1995). Efecto de diferentes factores sobre la capacidad antimicótica de vainillina. Tesis de Maestría. Escuela de ingeniería. Universidad de las Américas-Puebla.
- López, I. (2004). Evaluación del efecto inhibitorio de las especias: clavo, laurel, orégano y pimienta negra en el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- López-Martínez, R. (2005). Ecología de los hongos patógenos para el hombre. Rev. Mexicana de Micología. Soc. Mexicana. 021. Pp. 85-92.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. (2001). Brock Biología de los microorganismos. Editorial Pearson. 10^{ma} edición.
- Magan, N., Aldred, D., (2005). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. Food Additives and Contaminants 22, 10-16.
- Mahmoud, L.E. (1994). Antifungal action and aflatoxigenic properties of some essential oil constituents. Letters in Applied Microbiology. 19: 110-113.
- Manual básico de Microbiología CULTIMED. (2003). 4ta edición. Panreac Química S.A.

- Martínez, A. (1986). Comparación de diferentes medios para evaluar hongos y levadura en granos y semillas e incidencia de aflatoxina en maíz. Trabajo de Ascenso. Facultad de ciencias. UCV.
- Martínez, A. (1998). Deterioro fúngico de los alimentos e impacto económico de las micotoxinas. An. Ven. de Nut. 11 (1): 37-47.
- Martínez, A. (1991). Contribución al estudio de la flora fúngica, su toxigenicidad e incidencia de aflatoxinas en cereales y oleaginosas cultivadas en Venezuela. Trabajo de Ascenso. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
- Martin Jr, R. A. (1987) Chocolate. Avd. Food Sci. 31: 211-342.
- Mazzani, C. (1983). Microflora de granos de maní (*Arachis hipogea L.*), maíz (*Zea mays L.*) y cacao (*Teobroma cacao L.*), almacenados en Venezuela. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de profesor Asistente. UCV.FAGRO.85 pag.
- Meyer, B., Biehl, M. Bin, S. and Samarokoddy. (1989). A method for pulp preconditioning to impar strong nib acidification during cocoa fermentation in Malasya. J. Sci. Food Agric. 48: 285-304.
- Minifie. B, (1989). Chocolate, cocoa and confectioner: science and technology. Tercera edición. Champan & Hall, pp 45-68.

- Molina, M. (1989). Manual técnico de cultivo de cacao en Venezuela. Ministerio de Agricultura y Cría. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Fondo Nacional del Cacao. Estación Experimental Miranda. Caracas-Venezuela.
- Moss, M.O., (1996). Mycotoxins. Centenary review. *Mycological Research* 100, 513–523.
- Neergard, P. (1979). Seed pathology. Chapter 7: Storage Fungi. The Mc. Millan Press LTD. London. Rev. ed., 1020p.
- Nogales, J., Graziani de Fariñas, L. y Ortiz de Bertorelli, L. (2006). Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera. *Agronomía Trop.* 56(1):5-20.
- Ortiz de Bertorelli, L., Camacho, G., Graziani de Fariñas, L. (2004). Efecto del secado al sol sobre la calidad del grano fermentado de cacao. *Agronomía Trop.* 54(1):31-43.
- Ortiz de Bertorelli, L., y L. Graziani de Fariñas, L. (1995). Caracterización física y química de genotipos de cacao del estado Aragua. Instituto de Química y Tecnología. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Mimeografía. 16 p.

- Ortíz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L. y Gervaise, R. L. (2009). Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Trop.* 59(2):119-127.
- Oyeniran, J. O. (1973) Internal Mouldines of commercial cocoa in Ibadan Western of the Nigeria Stored Products Research Institute N° 2: 19-27.
- Paster, N. Hemasherov, M., Ravid, U., and B. Jeven (1994). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. food protection.* 58:286-288.
- Pettier, H. (1935). Degeneration of cacao through natural hibridizaton. *Journal of Heredity.*
- Pound, F. (1933). The genetical constitution of the cocoa crop. In: Imperial College of Tropical Agriculture. Trinidad. Annual report on cocoa research. 1(10): 24-193.
- Puziah, H., Jinap, S., Kharidah, M. and Sabih, A. (1999). Effect of drying time, bean depth and temperature on free amino acid, peptide-N sugar and pyrazine concentrations of Malasyan cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.* 79:987-994.
- Ram, C. (1976). Moulds of commercial cocoa and their infection origin in farm processing cocoa in Bahia, Brazil. *Fitopatología Brasileira* 1 (2): 77-89.

- Ramos, G.; Ramos, P.; Azócar, A. (1993). Beneficio del cacao. Plan coordinado de la gobernación de Mérida. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Estación experimental Mérida. Venezuela. Pp. 2-54.
- Raybaudi, R. (1999). Evaluación de diferentes métodos y medios micológicos para la recuperación de mohos totales y mohos micotoxigénicos a partir de maíz y determinación de aflatoxinas y fumonisinas. Trabajo de Asenso. Facultad de Ciencias UCV.
- Reyes, H; Capriles de Reyes, L. (2001). Manual Técnico para la producción de cacao. Caracas, Chocolates El Rey. 350 p.
- Reyes, H. y De Reyes, C. (2000). El cacao en Venezuela. Moderna tecnología para su cultivo. Edit. Chocolates El Rey. Caracas, Venezuela. 270 pp.
- Rasooli, I. y Owlia, P. (2005) Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry* 66, 2851–2856.
- Rivera. C y Garcia. F (2007). Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria de aceite. *BioTecnología*, vol. 11 N° 2.
- Rohan, T. (1964). El beneficio del cacao bruto destinado al mercado. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 223p.
- Romer TM, LABS. (2000). Mycotoxins – an overview. Guía para micotoxinas. 2da Edición.

- Salazar, M. L. y Guaita, C. A. (1985). *Caucagua y Cayapa: Importancia del comercio cacaotero en la implantación y desarrollo de la región, 1680-1880*. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Humanidades y Educación. Escuela de Historia. Trabajo Especial de Grado.
- Samson, R.; Hoekstra, E.; Frisvad, J. y Filtenborg, O. (1995). *Introduction to food-borne fungi*. Editorial CBS, cuarta edición 324 pág.
- Sanchez M., Gil J., Bisbal F., Ramón D. y Martínez P. (2008). *Mycobiota and micotoxin producing fungi from cocoa beans*. *International Journal of Food Microbiology* 125, 336-340.
- Senanayake, M., E. Jansz y K. Buckle. (1997). *Effect of different mixing intervals on the fermentation of cocoa beans*. *J. Sci. Food Agric.* 74: 42-48.
- Shelef, L. A., Jyothi, E. K. y Bulgarelli, M. A. (1984). *Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods*. *J. Food Sci.* 49: 737740, 809.
- Štefčić Klaric, M., Kosalec, I., Mastelić, J., Pieckova, E. y Pepeljnak S. (2006). *Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings*. *J.C. L.A.M.* Vol. 44: 36–42.
- Tassou, C. C. y Nychas, G. J. E. (1994). *Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolics in broth and in a model food system*. *J. of Food Protection.* 57 (2): 120 124.

- Thompson, S.; Miller, K.; López, A. (2001). Cacao y café. En: Microbiología de los alimentos, fundamentos y fronteras. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España.
- Tortora, G. (2007). Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana. 9^{na} edición.
- Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J., (1999). Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.
- Vidal, E. (1999). Servicio informático de la organización de estados Iberoamericanos para la educación la ciencia y la cultura. Disponible en: <http://www.foncacao.com.ve>.
- Voigt, B. (1995). Precursor of the cocoa specific aroma components are derived from the vicilin-class (7S) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. Rev. Bot. Acta, 108: 299-307.
- Wilbaux, R. (1965). The problems raised by the stored of cocoa, café, cacao, The (Paris) 9 (1): 24-36.
- Wood, G. A. R. A., and Lass, R. A. (1985). Cocoa. 4ta Ed. Bunt-Mill,- Harlow, Essex,-UK;-Longman-Group-Ltd. London. 620 pp.

- Zambettakis, C: F.; F., Waliyar; A., Bockelee-Morvan and O. de Pins. (1981). Results of four years of research on resistance of groundnut varieties to *Aspergillus flavus*. *Oleagineux* 36(7):377-383.
- Zapata,R., Sanabria, María E y Rodriguez, N. (2003). Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardon lefaria (*Cereus deficiens* OTTO & Diert). *Interciencia*. 28:005. Pp. 302-306.
- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Hiang, H., Yang, Z., Ji, J., Ji, J., Ren, Y., y Yan, W. (2007). Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella thyphimurium*. *J Food Prot.* 70. pp. 1704 – 1709.