



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y GRADO DE INFESTACIÓN DE  
MOHOS EN GRANOS DE CACAO (*Theobroma cacao L.*),  
FERMENTADOS Y SECADOS, PROVENIENTES DE DIFERENTES  
PRODUCTORES DEL ESTADO MIRANDA.

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela,  
por la bachiller Marielys Castrillo Parra  
como requisito parcial para optar al  
título de Licenciado en Biología

Tutor (es): M.Sc Rosa Virginia Díaz

Dr. Clímaco Álvarez

CARACAS, VENEZUELA

JULIO 2012

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, porque fueron ustedes quienes inculcaron en mí, los valores y conductas que hoy tengo como normativa en la vida. El triunfo de este trabajo es gracias a ustedes y al esmero para que cada día sea una mejor persona.*

*A mi hija Mariangel, que está en mi vientre, para que esto sirva como modelo en tu vida y te aliente a progresar y prepararte académicamente. ¡Sí se puede!*

## **AGRADECIMIENTOS**

Doy gracias a mi Padre Celestial por llenarme de bendiciones en el transcurso de mi vida, por ser mi fortaleza, por permitirme alcanzar mis metas y por ser mi aliento para levantarme y seguir adelante.

Gracias a mis padres, por estar allí siempre para aplaudir mis logros, por darme ánimo, por transmitirme confianza y por apoyarme en todo momento. Madre gracias por madrugar conmigo cuando tenía que estudiar o terminar mis trabajos, por levantarme en las mañanas para que fuera a clases y prepararme mis comidas. Padre gracias por llevarme cada día al terminal a tomar el transporte y por razonar conmigo cuando no entendía algún texto de interés.

Gracias a mi esposo, por ser mí amigo y compañero, por comprenderme y tenerme paciencia durante mi preparación académica.

Gracias a mi hermana Mayerling, por ser un ejemplo de perseverancia en los estudios y por aportarme parte de sus conocimientos.

Gracias a la Universidad Central de Venezuela por darme la oportunidad de formarme como profesional.

Gracias al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) por prestarme sus espacios para culminar mi trabajo especial de grado. Igualmente al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) en el

Estado Miranda y al Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) en Maracay, Estado Aragua.

Gracias al proyecto LOCTI AGI-004MIR n° 201100565 del FONACIT adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación.

Gracias a mi tutora Rosa Virginia Díaz por dirigir mí trabajo de grado y a mi tutor Clímaco Álvarez por su apoyo incondicional.

Gracias a mis jurados la profesora Leymaya Guevara y Amaury Martínez, por corregirme y ser mi fuente inmediata de consulta.

Gracias a Beira Rojas por el aporte que me ofreció en el área de microbiología. Igualmente gracias a Freddy González por ayudarme con el material de laboratorio y el uso de los equipos.

## INDICE GENERAL

	Pág.
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xii
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II.OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. EL CACAO.....	5
2. CARACTERÍSTICAS DEL CACAO.....	5
2.1 EL ARBOL.....	5
2.2 SISTEMA RADICAL.....	6
2.3 TALLO Y RAMAS.....	6
2.4 LA HOJA.....	7
2.5 LA FLOR.....	8
2.6 EL FRUTO.....	10
2.7 LA SEMILLA.....	13
3. CLASIFICACIÓN DEL CACAO.....	14
3.1 CACAO CRIOLLO.....	14
3.2 CACAO FORASTERO.....	15
3.3 CACAO TRINITARIO.....	16
4. BENEFICIO DEL CACAO.....	16

4.1 COSECHA.....	17
4.2 DESGRANE.....	18
4.3 FERMENTACIÓN.....	19
4.4 SECADO.....	22
5. MOHOS.....	24
5.1 CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL CRECIMIENTO DE LOS MOHOS	25
5.2 MOHOS EN LOS ALIMENTOS.....	26
5.3 MOHOS EN EL CACAO.....	28
6. MICOTOXINAS.....	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
1. MATERIA PRIMA.....	34
1.1 BENEFICIO Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.....	36
1.2 TOMA DE MUESTRAS.....	36
1.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	37
2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS GRANOS.....	37
2.1 PRUEBA DE CORTE DE CALIDAD.....	37
2.2 ANÁLISIS PROXIMAL.....	38
2.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.....	38
3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	39
3.1 DETERMINACIÓN DEL CONTAJE TOTAL DE MOHOS Y SU IDENTIFICACIÓN	39
3.2 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE COLONIZACIÓN.....	43
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO.....	45
1.1 PRUEBA DE CORTE.....	45
1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL.....	50
1.2.1 HUMEDAD.....	51
1.2.2 CENIZAS.....	53
1.2.3 PROTEÍNA CRUDA.....	55
1.2.4 GRASA CRUDA.....	56
1.2.5 FIBRA CRUDA Y OTROS CARBOHIDRATOS.....	58
1.3 pH Y ACIDEZ TITULABLE.....	59
2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	62
2.1 RECUENTO DE MOHOS TOTALES EN MUESTRAS DE CACAO CORRIENTE (NO FERMENTADAS Y SECADAS)	62
2.2 RECUENTO DE MOHOS TOTALES EN MUESTRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECADAS O NO	66
2.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS MOHOS PRESENTES EN GRANOS DE CACAO	70
2.4 GRADO DE INFESTACIÓN EN MUESTRAS DE CACAO NO FERMENTADAS Y SECADAS	94
2.5 GRADO DE INFESTACIÓN EN MUESTRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECADAS O NO	98
VI. CONCLUSIONES.....	101
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Prueba de corte de calidad en granos de cacao fermentados y secados	45
Tabla 2. Composición química proximal en granos de cacao fermentados y secados	51
Tabla 3. pH y acidez total titulable en granos de cacao fermentados y secados	60
Tabla 4. Contaje total de mohos en granos de cacao corriente (sin fermentar y secados), almacenados bajo las mismas condiciones	62
Tabla 5. Contaje total de mohos en granos de cacao fermentados y secados en diferentes zonas del Estado Miranda	66
Tabla 6. Principales especies de mohos aislados de la muestra Oderí I	72
Tabla 7. Principales especies de mohos aislados de la muestra Oderí II	75
Tabla 8. Principales especies de mohos aislados de la muestra del INIA	78
Tabla 9. Principales especies de mohos aislados de la muestra El Rosario	81
Tabla 10. Principales especies de mohos aislados de la muestra El Verde	84
Tabla 11. Principales especies de mohos aislados de la muestra El Vigía	88

Tabla 12. Principales especies de mohos aislados de la muestra Curiepe	89
Tabla 13. Principales especies de mohos aislados de la muestra La Trinidad	90
Tabla 14. Grado de colonización de granos de cacao sin fermentar y secados, de dos variedades, almacenados bajo las mismas condiciones	95
Tabla 15. Grado de colonización de granos de cacao fermentados y secados en diferentes zonas del Estado Miranda	98

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Árbol de cacao.....	5
Figura 2. Raíz de planta de cacao.....	6
Figura 3. Hojas de una planta de cacao.....	7
Figura 4. Inflorescencia de la planta de cacao.....	8
Figura 5. Cacao Amelonado.....	12
Figura 6. Cacao Calabacillo.....	12
Figura 7. Cacao Angoleta.....	12
Figura 8. Cacao Cundeamor.....	12
Figura 9. Semillas de cacao.....	14
Figura 10. Esquema del proceso de cacao.....	17
Figura 11. Desgrane de mazorca de cacao.....	19
Figura 12. Fermentación de cacao en cajones de madera.....	22
Figura 13. Secado natural de granos de cacao.....	23
Figura 14. Metodología utilizada para evidenciar la incidencia de mohos en granos de cacao	41
Figura 15. Metodología utilizada para el aislamiento e identificación de los mohos	42
Figura 16. Metodología utilizada para determinar el grado de infestación en granos de cacao	44
Figura 17. Niveles de mohos en granos de cacao corriente (sin fermentar y secados) de dos variedades, almacenados bajo las	63

mismas condiciones

Figura 18. Recuento de mohos en placas de agar DRBC para la muestra Oderí I 64

Figura 19. Niveles de mohos en granos de cacao fermentados y secados en diferentes zonas del Estado Miranda 67

Figura 20. Principales especies de mohos aislados de la muestra Oderí I 72

Figura 21. *Penicillium citrinum* visto al microscopio..... 73

Figura 22. Colonias de *Geotrichum candidum* aisladas en placas de Czapek y EMA 74

Figura 23. Macroconidias de la especie *Fusarium sambucinum* vistas al microscopio 75

Figura 24. Principales especies de mohos aislados de la muestra Oderí II 76

Figura 25. *Rhizopus sp.* visto al microscopio..... 76

Figura 26. *Fusarium proliferatum* visto al microscopio..... 77

Figura 27. Principales especies de mohos aislados de la muestra del INIA 79

Figura 28. Colonias de *Aspergillus penicillioides* aisladas en placas de Czapek y EMA. 79

Figura 29. *Penicillium expansum* visto al microscopio..... 80

Figura 30. Principales especies de mohos aislados de muestra El Rosario 81

Figura 31. <i>Alternaria alternata</i> visto al microscopio.....	82
Figura 32. <i>Cladosporium sphaerospermum</i> visto al microscopio.....	84
Figura 33. Principales especies de mohos aislados de la muestra El Verde	85
Figura 34. <i>Cladosporium macrocarpum</i> visto al microscopio.....	85
Figura 35. <i>Aspergillus flavus</i> visto al microscopio.....	86
Figura 36. <i>Aspergillus candidus</i> visto al microscopio.....	88
Figura 37. Principales especies de mohos aislados de la muestra Curiepe	89
Figura 38. Colonias de <i>Aspergillus versicolor</i> aisladas en placas de Czapek y EMA	90
Figura 39. Principales especies de mohos aislados de la muestra La Trinidad	91
Figura 40. Grado de infestación en la muestra Oderí I.....	95
Figura 41. Grado de infestación en la muestra Oderí II.....	96
Figura 42. Granos de cacao de la muestra Oderí II infestados por <i>Fusarium tricinctum</i>	97
Figura 43. Grado de infestación en granos de cacao fermentados y secados	99

## RESUMEN

El presente estudio que se plantea a continuación, fue realizado con el propósito de detectar los mohos del cacao (*Theobroma cacao*) fermentados, secados y almacenados, provenientes de diferentes proveedores del Estado Miranda (específicamente en los sectores de Tapipa, El Rosario, El Verde, Curiepe, La Trinidad y Río Chico) de los Municipios Acevedo, Páez, Brión, Pedro Gual y San José de Barlovento; y el Vigía en el Estado Mérida, a fin de establecer teóricamente su posible capacidad micotoxigénica.

Con respecto a los análisis fisicoquímicos para las muestras fermentadas y secadas, se encontró que en cuanto a la composición química proximal, el contenido de humedad oscilaba entre 5,15- 6,30%, para las cenizas los valores se encontraban entre 3,75- 4,50%, proteínas crudas entre 14,27-16,49%, grasa cruda entre 40,49-45,50%, fibra cruda entre 12,58% y 18,06% y otros carbohidratos entre 15,13-17,66%. Por otra parte, los valores de pH oscilan entre 5,54-6,43 y para la acidez total titulable se alcanzó un rango entre 0,81-1,32%.

El análisis microbiológico mostró un recuento total de mohos en granos sin fermentar y secados de 2,972 Log<sub>10</sub> (UFC/g) y 5,256 Log<sub>10</sub> (UFC/g), para las muestras designadas como Oderí I y Oderí II, respectivamente. Ahora bien, para los granos fermentados, secados y almacenados se obtuvo un conteo igual a 3,649, 4,628, 4,327, 6,980, 5,540 y 5,604 Log<sub>10</sub> (UFC/g) para las muestras de INIA, El Rosario, El Verde, El Vigía, Curiepe y La Trinidad, respectivamente. En cuanto al grado de

infestación, se determinó que las muestras de El Vigía, Curiepe y La Trinidad mostraron una infestación de granos máxima (100%), seguida por la de El Verde (71%), la de INIA (70 %) y la de El Rosario cuyo porcentaje de infestación fue de sólo 60 %. La muestra Oderí I 90%, mientras que la muestra Oderí II 75% de infestación.

Además se pudo aislar e identificar 14 especies de mohos en la totalidad de las muestras, las cuales fueron: *Penicillium citrinum*, *Penicillium variable*, *Penicillium expansum*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium proliferatum*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus versicolor*, *Rhizopus sp.*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium macrocarpum*. De las especies mencionadas anteriormente casi todas tienen capacidad de producir metabolitos tóxicos, con excepción de *Geotrichum candidum*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus penicillioides*, *Cladosporium sphaerospermum* y *Cladosporium macrocarpum*, que no son considerados micotoxigénicos.

Las muestras correspondientes a Oderí I y El Rosario, fueron las que mostraron mayor diversidad de mohos durante el aislamiento. Además *Penicillium citrinum* estuvo presentes en ambos casos, siendo más predominante en la primera muestra con un 48%. Esta misma especie se encontró en la muestra de El Vigía, pero fue la única aislada, constituyendo el 100%.

Se deben tomar medidas preventivas al momento de manipular las muestras designadas como Oderí I y Oderí II, INIA, El Rosario, El Verde, El Vigía y Curiepe, ya que las mismas revelaron desarrollo de mohos micotoxigénicos, no así para la muestra de La Trinidad.

## I. INTRODUCCIÓN

La palabra cacao proviene del maya “Kaj”, que quiere decir amargo y “Kab”, que quiere decir jugo. Estas dos palabras al pasar al castellano, sufrieron una serie de transformaciones que terminaron en “cacaotal”, que luego pasó a “cacao” (Enríquez, 1985). Los aztecas creían que el árbol de cacao era de origen divino y que su bebida confería discreción y sabiduría. Por eso Linneo asignó a la especie el nombre de Theobroma, que significa alimento de los dioses (Batista, 2009).

El cultivo del cacao tuvo su origen en América, pero no se puede indicar con precisión el lugar específico ni su distribución. Aún hoy día sigue siendo tema de discusión. Algunos autores indican que el cultivo de cacao se inició en México y América Central y señalan al mismo tiempo que los españoles no lo vieron cultivado en América del Sur cuando arribaron este continente, aunque lo encontraron creciendo en forma natural en muchos bosques a lo largo de los ríos Amazonas y Orinoco y sus afluentes (Batista, 2009).

Según estudios de Pound (1934), el cacao es originario de América del Sur, del área del alto Amazonas, que comprende países como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil, siendo este último donde se ha encontrado la mayor variabilidad de la especie. Desde este lugar de origen las especies se fueron difundiendo.

El cacao es una planta que se cultiva desde tiempos inmemorables. En la época de Cristóbal Colón era empleada por los mayas y los aztecas en diferentes formas. Desde el descubrimiento de la planta por los europeos, el desarrollo del cultivo ha evolucionado rápidamente (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1984). Las semillas de cacao fueron llevadas de su habitat natural para otros territorios. En la actualidad el cacao se ha expandido a todos los países que disponen de tierras tropicales húmedas, convirtiéndose en un cultivo verdaderamente popular (Enríquez, 1985).

El cacao en Venezuela fue encontrado en forma silvestre durante la conquista, aunque no puede decirse con exactitud que nuestros aborígenes lo cultivasen, sin embargo, se acepta que éstos preparaban una infusión conocida como “Chorote”, a partir de granos de cacao que procedían de plantaciones del estado Mérida (Liendo, 2000). Posteriormente, se desarrollaron cultivos en las cercanías del lago de Maracaibo y cordillera andina (Salazar y Guaita, 1985).

En Venezuela la producción cacaotera está repartida en 3 regiones grandes, que comprenden 13 entidades federales. La región Nor-oriental (estados: Sucre, Monagas y Delta Amacuro); la región centro Norte-costera (estados: Miranda, Aragua, Guárico, Carabobo y Yaracuy) y la región Sur-occidental (estados: Táchira, Apure, Barinas, Mérida y Zulia) (Leal, 1999).

El cultivo de cacao ha sido una actividad de larga tradición de Venezuela, cuya producción ha significado un importante rubro agrícola, tanto para la inversión como por las fuentes de trabajo que se originan en las zonas donde se explota. Por ser un cultivo permanente y dependiente de la mano de obra, la calidad de sus granos continúan gozando de fama internacional, constituyendo hasta los actuales momentos un renglón generador de divisas para el país (Álvarez, 1998).

Es preciso añadir que las malas condiciones de almacenamiento y alta humedad determinan el desarrollo de mohos en los granos de cacao. Adicionalmente estos microorganismos pueden, bajo condiciones determinadas, generar micotoxinas, que no son más que productos metabólicos tóxicos que representan un peligro para la salud humana y animal (Liendo, 2000). Pueden causar daños variables dependiendo del tipo y concentración en los alimentos. El daño puede ser leve y pasar desapercibido o hacerse cada vez más severo hasta ocasionar la muerte (Mazzani, 1983).

En el presente trabajo de investigación se pretende detectar e identificar los mohos en granos de cacao (*Theobroma cacao L.*), así como establecer comparaciones con sus características fisicoquímicas, cumpliendo para esto con una metodología previamente establecida, diseñada experimentalmente y un análisis estadístico de resultados, que constituirán un gran aporte a la agroindustria del país.

## II. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 1. OBJETIVO GENERAL

Detectar los mohos del cacao (*Theobroma cacao L.*) fermentados, secados y almacenados, provenientes de diferentes productores del Estado Miranda y establecer teóricamente su posible capacidad micotoxigénica.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar y aislar los mohos de granos de cacao fermentados y secados, provenientes de distintos productores.
- Evaluar el grado de infestación de los mohos del cacao.
- Identificar taxonómicamente los principales mohos colonizantes del cacao. Establecer la diferencia en la contaminación de mohos entre los distintos productores.
- Determinar las características fisicoquímicas de los granos de cacao provenientes de diferentes proveedores.
- Relacionar las características fisicoquímicas con la contaminación de mohos.
- Establecer teóricamente, su posible capacidad micotoxigénica, de los diferentes mohos aislados.

### III. REVISION BIBLIOGRAFICA

#### 1. EL CACAO

El cacao, *Theobroma cacao*, es una especie diploide ( $2n=20$ ), nativa del bosque pluvial del Neotrópico, perteneciente a la familia Malvaceae, del género *Theobroma* y a la especie cacao, y es la única especie del género *Theobroma* que se explota comercialmente (Cuatrecasas, 1964).

#### 2. CARACTERÍSTICAS DEL CACAO

##### 2.1 EL ÁRBOL

Alcanza una altura entre 6 a 8 metros, con algunas excepciones que llegan a medir hasta 12 metros. La altura depende de factores ambientales. Cultivado con alta luminosidad el tamaño es menor que con exceso de sombra (Batista, 2009).



**Fig. 1. Árbol de cacao**

**Fuente:** <http://www.confiteriamarques.com/index.php/m,37/el-cacao>

## 2.2 SISTEMA RADICAL

Tienen una raíz primaria pivotante, su longitud y forma varía de acuerdo a las condiciones físicas del suelo, pudiendo alcanzar hasta 3 metros en forma recta. La mayoría de las raíces secundarias se encuentran en el cuello de la planta, en la porción superior de 15 a 20 cm. de la capa superficial del suelo. Estas raíces secundarias crecen horizontalmente y se dividen muchas veces, pudiendo extenderse hasta 5 a 6 metros del tronco. Sus puntos terminales tienden a crecer hacia arriba dentro de la capa húmica (Ramos, 1993).



**Fig. 2. Raíz de la planta de cacao**

**Fuente:** Batista, (2009).

## 2.3 TALLO Y RAMAS

Las ramas del árbol de cacao, al igual que las de otras especies del género *Theobroma*, son dimórficas. Unas son de crecimiento vertical hacia arriba, denominadas ramas de crecimiento ortotrópico; otras son de

crecimiento oblicuo hacia afuera, denominadas ramas de crecimiento plagiotrópico. Las plantas de cacao reproducidas por semillas, desarrollan un tallo principal de crecimiento vertical que puede alcanzar 1 a 2 metros de altura, a la edad de 12 a 18 meses. A partir de ese momento la yema apical detiene su crecimiento y del mismo nivel emergen de 3 a 5 ramas laterales (Batista, 2009).

## 2.4 LA HOJA

Exhiben pigmentaciones diferentes, siendo desde muy hasta poco pigmentadas. En todo caso las hojas adultas son completamente verdes, de lámina simple, entera, con forma que va desde lanceolada a ovalada, margen entero, nervadura pinnada, y ambas superficies glabras. El nervio central es prominente y el ápice de la hoja es agudo. Las hojas están unidas al tronco o a las ramas por medio de los pecíolos (Batista, 2009).



**Fig. 3. Hojas de una planta de cacao**

**Fuente:** Batista, (2009).

## 2.5 LA FLOR

Las flores nacen directamente en la madera vieja del tallo principal y las ramas laterales. Las flores se agrupan en inflorescencias conocidas como cima dicasiforme, pero las ramas de la cima están muy reducidas o comprimidas en una estructura corta en forma de tallo conocida como cojín floral, un solo cojín contiene 40 a 60 flores. La flor abre de 20 a 25 días después de aparecer el botón floral, y de no ser fecundada, esta se cae mediante un estrangulamiento en la zona de abscisión del péndulo (Guzmán, 2007).



**Fig. 4.** Inflorescencia de la planta de cacao

**Fuente:** Batista, (2009).

La flor es hermafrodita, pentámera, de ovario súpero. Está constituida en su estructura floral por 5 sépalos, 5 pétalos; el androceo conformado por 10 filamentos de los cuales 5 son fértiles (estambres) y los otros 5 son infértiles (estaminoides); el gineceo (pistilo) está formado por un ovario

súpero con 5 lóculos fusionado desde la base donde cada uno puede contener de 5 a 15 óvulos, dependiendo del genotipo (Batista, 2009).

Otro factor muy importante en el desarrollo del cultivo ha sido la característica de incompatibilidad genética. Este aspecto ha desarrollado muchas investigaciones; a consecuencia de esto se determinó la alta condición de alogamia, tanto así, que alcanza un 95% de auto-incompatibilidad. En este sentido para la fecundación de la flor es necesario que el polen provenga de otra planta, cuya fórmula genética de compatibilidad sea diferente al árbol madre ya que algunos genes influyen para que el propio polen de la planta no pueda fecundar sus óvulos. Otra característica que favorece la incompatibilidad genética, es la estructura de la flor del cacao que por la disposición natural de sus órganos, se dificulta en grado extremo la transferencia de polen por medio de insectos y la imposibilita definitivamente por medio al viento (Batista, 2009).

La polinización natural del cacao es estrictamente entomófila. Normalmente ocurre en horas de la mañana cuando el estigma de la flor recién abierta está receptivo y el polen funcional. El insecto visita la flor y en su recorrido por su interior deja algunos granos de polen, que normalmente vienen de la flor visitada anteriormente y que tenía adherido a los pelos de las patas y el abdomen. En este momento la flor queda polinizada. Solo una mosquita diminuta del género *Forcypomia* es la responsable de la polinización de cacao (Soria, 1973).

## 2.6 EL FRUTO

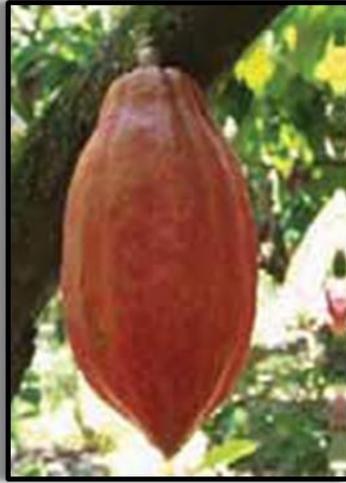
El fruto del cacao es el resultado de la maduración del ovario de la flor fecundada. Dentro de su clasificación botánica el fruto de cacao es una drupa normalmente conocido como mazorca. Tanto el tamaño como la forma de los frutos varían ampliamente dependiendo de sus características genéticas, el medio ambiente donde crece y se desarrolla el árbol, así como el manejo de la plantación (Batista, 2009).

El fruto de cacao presenta una cáscara o pericarpio, con tres partes bien diferenciadas: el epicarpio o sección exterior, que puede o no tener pigmentación, es esponjoso y suave, de espesor muy diverso, que dependiendo del árbol puede medir entre 15 -25 cm de largo por 7-10 cm de ancho (Belitz y Grosch, 1988). El mesocarpio forma la segunda capa y está constituida por células semileñosas que difieren en su grado de dureza de acuerdo al genotipo de la planta. La capa interior o endocarpio es carnoso, suave y su espesor es variable; es una capa casi continua con el mucilago de la mazorca, pero se diferencia claramente al madurar el fruto (Álvarez, 1998).

El color de las mazorcas varía con muchas tonalidades, pero en realidad existen dos colores básicos, el verde y el color rojo. Las superficies de las mazorcas se presentan desde lisas hasta fuertemente rugosas, con surcos superficiales o profundos y lomos individuales o pareados. Por sus

formas están clasificadas como: Amelonado, Calabacillo, Angoleta y Cundeamor (Batista, 2009).

- **Amelonado:** son ovaladas, redondeadas por el extremo, con o sin constricción en la base, el ancho es inferior a la mitad de su longitud. Superficie lisa o suavemente verrugosa, con surcos poco marcados (Álvarez, 1998).
- **Calabacillo:** son de formas redondeadas a ovaladas, con o sin cuello de botella, generalmente simétricas, de puntas cortas, cáscaras lisas y con los surcos pocos marcados (Álvarez, 1998).
- **Angoleta:** la mazorca es larga y semiredonda, con una extremidad en forma de punta redonda, amplia en la base sin presentar estrangulación a modo de cuello de botella. Los surcos son muy profundos y la superficie es muy verrugosa. Es considerada como la variedad más cercana al tipo Criollo (Álvarez, 1998).
- **Cundeamor:** la mazorca es alargada, puntiaguda en su extremo apical, presenta una base angosta en forma de cuello de botella. Los surcos son profundos y de superficie muy verrugosa (Álvarez, 1998).



**Fig. 5. Cacao Amelonado**



**Fig. 6. Cacao Calabacillo**



**Fig. 7. Cacao Anjoleta**



**Fig. 8. Cacao Cundeamor**

**Fuente:** Batista, (2009).

La cáscara del fruto es, en general, un subproducto voluminoso que se aprovecha durante las cosechas y comprende alrededor del 70-80 % del peso total del fruto (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1989). Generalmente, es utilizado como abono orgánico por su alto contenido de sales de potasio (Adomako, 1996).

## 2.7 LA SEMILLA

El fruto del cacao puede contener entre 20 a 50 semillas o almendras, cuyo tamaño y forma varían según el tipo genético. La semilla del cacao está constituida por dos cotiledones y un embrión que está protegido por ambos cotiledones. En el exterior se encuentra el endosperma, que es sumamente reducido y toma la forma de una membrana conocida como testa, la cual es delgada y coriácea, envuelta en su periferia por una pulpa ácida y azucarada que se llama mucílago (Batista, 2009).

La pulpa o mucílago que rodea a los granos dentro del fruto provee las condiciones adecuadas para el proceso de fermentación y a la formación de las sustancias precursoras del sabor y aroma de los granos de cacao. El mucílago se compone aproximadamente de 80% agua, 10% azúcares, 2% ácido cítrico, pectinas y aminoácidos libres (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1993).

La semilla del cacao no necesita un período de reposo para su germinación, que puede ocurrir inmediatamente cuando el fruto alcanza su madurez y el mucílago que la cubre desaparece. Éste tiene sustancias inhibidoras, por lo que no se puede almacenar fresco ni ser sometido a temperaturas extremas que provocarían la muerte del embrión por fermentación o deshidratación. En condiciones óptimas, las semillas inician la germinación en 4 días (Batista, 2009).



**Fig. 9. Semillas de cacao**

**Fuente:** Batista, (2009).

### **3. CLASIFICACIÓN DEL CACAO**

Desde el punto de vista botánico, la especie *Theobroma cacao* se diferencia en tres grandes grupos: cacao Criollo, Forastero y Trinitario (Rohan, 1964).

#### **3.1 CACAO CRIOLLO**

Fueron antiguamente cultivados en América Central y México (Braudeau, 1975). Proporciona lo que comercialmente se designa como “extrafino”, se trata de un cacao muy aromático, que presenta un ligero sabor amargo y es utilizado en la industria chocolatera para la fabricación de productos de lujo, también es aprovechado para la producción de cacao en polvo con sabores aromatizantes para ser incorporados en bebidas instantáneas (Manual de productos básicos, 1991).

Las semillas son de color blanco o crema, con una gran calidad (Marquez, 2003). De igual manera los granos son grandes, de 3 a 4 cm. de longitud y de forma cilíndrica, su pulpa o mucílago es muy dulce, tiene un olor muy pronunciado y dulce. Su período de fermentación es corto y su cáscara es mucho más fácil de desprender, lo cual reduce los costos de procesamiento (Liendo, 2000).

Asimismo las mazorcas son rojas, de base ancha, alargadas, asimétricas, con la punta algo desviada hacia el tronco, de paredes delgadas, su superficie es muy rugosa (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2003).

### **3.2 CACAO FORASTERO**

Se encuentran en Brasil, en el Oeste Africano, Ecuador, en Centro y Sur América; es probable que se hayan originado en el alto Amazonas (Liendo, 2000). Son mazorcas verdes, con semillas violetas, de calidad inferior (Marquez, 2003). Sus semillas son aplanas, menores de 3 cm., color oscuro, sabor amargo, aroma poco pronunciado y requieren de 5 a 7 días para lograr su completa fermentación, su producción es más elevada y es bajo su contenido de grasa (Liendo, 2000).

Las mazorcas son ovoides, amelonados, con diez surcos superficiales, de cáscaras lisas o ligeramente verrugosas, delgadas o gruesas, con una capa lignificada presente en el centro del pericarpio, los dos extremos de la

mazorca son redondeados y a veces con un pequeño cuello de botella en la base (Álvarez, 1998).

### **3.3 CACAO TRINITARIO**

Es producto de una mezcla entre los dos grupos anteriores (Criollo y Forastero), por ello tienen diversidad de formas, tamaños y colores en la mazorca y semilla; la calidad es regular. Entre ellos hay clones que dan muy buen aroma y sabor a chocolate (Marquez, 2003). Este cacao fue introducido en Venezuela, desplazando a los antiguos cacaos Criollos (Liendo, 2000).

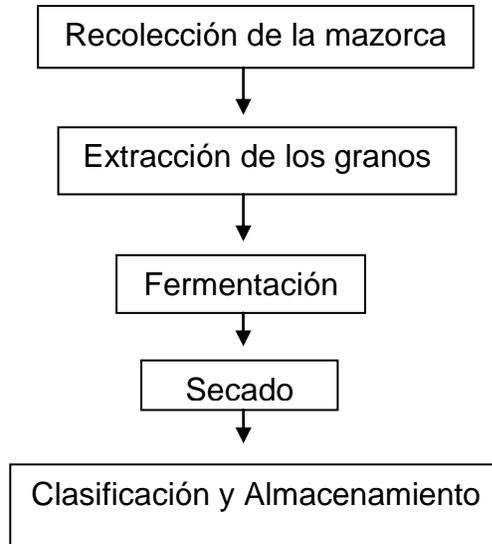
## **4. BENEFICIO DEL CACAO**

Son todas aquellas operaciones a las cuales ha de someterse un producto agrícola natural para convertirlo en un artículo comercializable; en el caso del cacao estas operaciones consisten, sucesivamente en: cosecha, desgrane, fermentación, secado, seguido de una buena clasificación y almacenamiento (Álvarez, 1997). Con la realización del beneficio se persiguen los siguientes objetivos:

- Descomponer y remover el mucílago azucarado que cubre el grano fresco, para facilitar el secado y almacenamiento.
- Elevar la temperatura que mata el embrión, para facilitar el desarrollo del sabor a chocolate.
- Mejorar el sabor y aroma de las almendras.
- Facilitar la separación final de la cubierta seminal del grano.

- Dar una buena apariencia en el mercado (Enríquez, 1985).

El proceso se puede resumir mediante el siguiente esquema:



**Fig. 10. Esquema del proceso de cacao**

#### **4.1 COSECHA**

Comprende la recolección de las mazorcas maduras, considerando el momento indicado por su cambio de color y cuando la placenta se encuentra suelta en el interior. Se cosecha casi todos los meses del año, pero con mayor intensidad en determinadas épocas que son denominados picos de cosecha y que están íntimamente relacionados con el régimen de lluvia de la localidad (Rohan, 1964).

La forma de recolección de las mazorcas es, en general, mediante el uso de herramientas bien afiladas como tijeras, machetes y/o cuchillos, para las partes bajas del árbol, las mazorcas de las partes altas se cosechan con

herramientas especiales como desgarraderas. El corte debe ser lo más cercano a la base de la mazorca, por el péndulo, para evitar daños en el cojinete floral de donde brotan los frutos (Rohan, 1964).

Si el fruto no está lo suficientemente maduro, aún no tiene pulpa, por lo que no se lleva a cabo la fermentación; los granos serán aplastados o achatados, de color morado, sabor amargo, en general de mala calidad. Por el contrario, si están excesivamente maduros también se afecta la calidad, tiene lugar la insuficiencia de pulpa, que afecta el proceso de fermentación, y pueden germinar los granos, con el posterior daño por plagas y enfermedades durante el almacenaje (Rohan, 1964). Antes de proceder se deben separar las mazorcas enfermas de las sanas con el uso de utensilios limpios (Marquez, 2003).

#### **4.2 DESGRANE**

La siguiente fase es abrir la mazorca para extraer los granos. Esta operación es costumbre hacerla con el machete, lo más común es tomar la mazorca con la palma de la mano y con la otra mano hacer un corte transversal con el machete y palanquear para que la cáscara se abra en dos, extrayéndose los granos y quedando la placenta adherida a la parte basal (Marquez, 2003).

El otro método es haciendo un corte en la parte apical, otro en el basal y uno a cada lado (a lo largo), se extraen los granos junto a la placenta y se

separa esta posteriormente. Los granos se echan en canastas, cubos o cestas plásticas (Marquez, 2003).



**Fig. 11. Desgrane de mazorca de cacao**

### **4.3 FERMENTACIÓN**

El cacao es uno de los productos que desarrolla sus características por una serie de fermentaciones que tienen lugar alrededor de la pulpa o mucílago. La secuencia y duración de las mismas son gobernadas por el tiempo e intensidad de la aireación y por las condiciones fisicoquímicas que regulan la proliferación y actividad microbiana (Passos, 1984). La adecuada fermentación de los granos frescos es el resultado de un proceso bioquímico de transformación externa e interna del cotiledón, que da como resultado la remoción de la pulpa que cubre el grano, la muerte del embrión, la conservación de los cotiledones y la generación de los precursores del aroma y sabor (Marquez, 2003).

La etapa inicial de la fermentación transcurre durante las primeras 24 a 36 horas, donde las levaduras transforman los azúcares disponibles en alcohol etílico, que finalmente a partir del cuarto día es oxidado en ácido acético por acción de las bacterias ácido lácticas, que luego se oxida a CO<sub>2</sub> y agua. Los cotiledones que tiene un pH cercano a la neutralidad (6,6) al absorber el ácido acético disminuyen su pH a valores próximos a 4,5 (Senanayake, 1997).

La altas temperaturas (alrededor de los 45°C) y la penetración del ácido acético a los tejidos internos de los cotiledones, promueven la muerte del embrión; al mismo tiempo ocurre una pérdida de la integridad celular por descomposición de la pared y membrana celular, y una difusión de los componentes del jugo celular, este fenómeno es mejor conocido como ósmosis (Jinap, 1990).

Las enzimas celulares se activan, para iniciar reacciones hidrolíticas, donde los pigmentos cianidinglucósidos de color púrpura, son transformados a azúcares y cianidina. A pesar de que estos pigmentos no son los responsables del aroma, hay una relación inversa entre desarrollo del sabor y el color púrpura retenido. Por otra parte, las antocianinas son hidrolizadas, por acción de las enzimas glicosidasa, en productos no coloreados que por oxidación toman un color pardo característico. Asimismo, se produce la condensación química de los compuestos polifenólicos en productos complejos insolubles, que tienen poco o ningún sabor. Los cotiledones disminuyen su astringencia considerablemente (Guzmán, 2007).

Los métodos más comunes para la fermentación son: en montones en el suelo, en canastos y en cajones de madera. La fermentación en montones es la práctica más tradicional para fermentar el cacao, porque requiere de dispositivos que son de escaso valor. Los granos húmedos se amontonan sobre hojas de plátano, los cuales poseen pequeños orificios para facilitar el drenaje de las exudaciones, la masa se cubre igualmente con el mismo material. Esta última operación es para disminuir la pérdida de calor durante la fermentación. Una variante del método consiste en levantar del suelo la capa de hojas que constituye la base, con palos de madera (Liendo, 2000).

La fermentación en canastos está más generalizado en pequeñas plantaciones cacaoteras. El método es sencillo porque sólo requiere cestas hechas de caña amarga u otro material de características parecidas. Los granos frescos son depositados en las cestas y luego estas son cubiertas con hojas de plátanos. El exudado de los granos ocurre por los lados laterales. Facilita la manipulación de la masa fermentante, su transporte y como medio de almacenamiento (Liendo, 2000).

La fermentación en cajones de madera está más orientado hacia la mayoría de las zonas cacaoteras de Centro, Suramérica, Indonesia, entre otras (Rohan, 1964). Se desarrolla en grandes plantaciones donde son elevadas las cantidades de cacao a fermentar. Las cajas se construyen de madera dulce diversas y con una variedad de formas y tamaños, las tablas están separadas 0,5 cm. para formar rejillas por donde salga el exudado de las almendras y proporcionar mayor ventilación a la masa (Liendo, 2000).



**Fig. 12. Fermentación de cacao en cajones de madera**

#### **4.4 SECADO**

Este es un proceso físico, químico y mecánico, mediante el cual se elimina el exceso de humedad de los granos y se completa la formación de los precursores del aroma y color característico (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1993). Por lo tanto, es imprescindible disminuir el contenido de humedad hasta 8% aproximadamente. Un deficiente secado en los granos causa importantes pérdidas financieras a compradores e industriales debido al desarrollo de hongos. Por otra parte, con un exagerado secado se obtendrían granos quebradizos y susceptibles al ataque de insectos, plagas, entre otros (Álvarez, 1998).

Los métodos de secado son natural (al sol) y artificial. Cuando el secado se realiza en forma natural, se corre el riesgo de enmohecimiento indeseable si la operación no se realiza con el cuidado que se requiere, o las condiciones climáticas son desfavorables (lluvias consecuentes y

abundantes). No obstante, por ser más lento permite que se completen las reacciones oxidativas y se facilita la eliminación de la acidez de los granos, produciendo un cacao con buenas cualidades sensoriales (Marquez, 2003).



**Fig. 13. Secado natural de granos de cacao**

Con el secado artificial se reduce el riesgo de enmohecimiento de los granos por la rápida remoción de humedad y por otra parte no es afectado por las variaciones climáticas, sin embargo, hay que garantizar que la temperatura dentro del grano sea inferior a 60°C para que las enzimas no se desactiven antes de que ocurra el pardeamiento de los granos; además cuando se usa madera como fuente de energía se corre el riesgo de que los granos se contaminen por el humo, si el proceso de combustión es deficiente este sabor hace que el producto sea inaceptable para la comercialización, ya que este defecto no se elimina por ningún medio (Marquez, 2003).

## 5. MOHOS

Comprenden un grupo bastante heterogéneo de hongos eucariotas multicelulares. Poseen una pared gruesa, semejante en grosor y en composición química a la pared de células vegetales, sin embargo, carecen de clorofila y por ende no son fotosintéticos (García, 2005).

Tienen una estructura muy ramificada llamada micelio, que pueden ser pequeño o grande. El micelio consta de ramificaciones individuales llamadas hifas. En algunos mohos las hifas son largas, conteniendo muchos núcleos, mientras en otros están divididas en células mononucleares por muros de partición, a menudo éstas son incoloras (Bylund, 1994).

Las hifas de un moho se pueden clasificar ya sea por su función o por la posición que ocupen en el medio donde se encuentran. De acuerdo con su función pueden ser hifas vegetativas (de crecimiento) o hifas fértiles (de reproducción) y según su posición en el medio, pueden ser hifas sumergidas o aéreas. Las hifas vegetativas son siempre sumergidas, ya que son las encargadas de absorber los nutrientes para el crecimiento. En la mayoría de los mohos, las hifas de tipo reproductor crecen sobre las superficies del medio (aéreas). El crecimiento de los mohos se produce en los extremos de las hifas, y se denomina por esto crecimiento distal o apical. En este proceso la hifa se va extendiendo y el citoplasma fluye hacia la nueva parte en formación. Al crecer también se van ramificando y cada ramificación, a su

vez, continúa el crecimiento apical y así sucesivamente hasta que se forman un conjunto de filamentos (García, 2005).

Se reproducen principalmente mediante esporas asexuales, otros lo hacen formando esporas sexuales. Las esporas asexuales tienen como función propagar la especie, se reproducen en gran cantidad y son pequeñas, luminosas y resistentes a la desecación. Se dispersan fácilmente en el aire y cuando asientan sobre materiales que les proporcionan nutrientes adecuados están capacitados para crecer y producir mohos (Pascual, 2005).

## **5.1 CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL CRECIMIENTO DE LOS MOHOS**

### **a. Oxígeno**

La mayoría son aerobios estrictos. Su crecimiento se ve favorecido cuando hay abundante suministro de oxígeno (García, 2005).

### **b. pH**

Tienen un rango muy amplio de tolerancia al pH. Pueden crecer en concentraciones relativamente altas de ácido, así como en medios bastantes alcalinos. El rango de pH para una gran mayoría es de 2 a 9, pero casi todos crecen mejor en un pH ácido. El pH óptimo se encuentra alrededor de 5,6 (García, 2005).

### **c. Temperatura**

La mayoría de los mohos son considerados mesófilos, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 22 y 30°C, algunas variedades tienen una temperatura óptima un poco más elevada, entre 30 y 37°C. Otros pueden crecer a temperaturas de refrigeración y aún a 0°C o menos. Además existe un pequeño grupo que tienen una temperatura óptima tan elevada como 62°C (García, 2005).

### **d. Concentración de solutos**

En su mayoría los mohos pueden crecer en medios cuya concentración de azúcares o sal, sería inhibitoria para la mayoría de las bacterias. Esta tolerancia a las altas concentraciones de soluto hace que estos microorganismos sean importantes en el deterioro de productos alimenticios como jaleas, confituras, carnes curadas, entre otros (García, 2005).

## **5.2 MOHOS EN LOS ALIMENTOS**

Los mohos tienen requerimientos nutricionales similares al resto de los seres vivos. Poseen la capacidad de utilizar una gran variedad de materiales orgánicos, tanto sencillos como complejos, pues son heterótrofos, por lo que el carbono debe provenir de compuestos orgánicos. Los carbohidratos simples, como la glucosa, son una fuente de carbono apropiada, así como sacarosa y maltosa. Otros compuestos de carbono más complejos, como

almidón y celulosa, pueden ser utilizados por muchos de ellos. En cuanto al requerimiento de agua, se puede decir que en general, la mayoría de los mohos necesita menos humedad que las bacterias. Por esta razón muchos de ellos crecen en medios tan secos como cereales, granos y harinas, entre otros (García, 2005).

Los nutrimentos necesarios para el crecimiento son obtenidos por absorción a través de la pared celular del micelio vegetativo, éstos deben encontrarse en forma soluble, en caso contrario, es decir, cuando son insolubles, las hifas segregan enzimas para degradar los alimentos (García, 2005). Su crecimiento sobre los alimentos se reconoce por su aspecto algodonoso- aterciopelado que, a veces muestra distintos colores. Pueden crecer en el interior de los alimentos o en su superficie, en cuyo caso el crecimiento se hace visible, gracias a su aspecto y colores característicos (Pascual, 2005).

Según Pascual (2005), los mohos cuando se asientan sobre los alimentos se sirven de ellos para nutrirse y multiplicarse, pero con distinto significado:

- **Mohos beneficiosos:** útiles en la elaboración de algunos alimentos (quesos).
- **Mohos perjudiciales:** productores de toxinas peligrosas (micotoxinas).

- **Mohos alterantes:** modifican las características propias de los alimentos.

La contaminación de los alimentos a partir de los mohos, puede tener como consecuencia su deterioro al originar una serie de cambios físicos, acompañados de olores y sabores anormales; pero de mucha mayor importancia es la capacidad de muchos de ellos para producir una gran variedad de metabolitos tóxicos (micotoxinas), a los que son sensibles el hombre y los animales (Pascual, 2005).

### **5.3 MOHOS EN EL CACAO**

El moho es un defecto que puede hacer que los granos de cacao resulten inadecuados. Los alimentos elaborados a partir de granos contaminados poseerán características organolépticas indeseables, lo cual se evidencia por un sabor desagradable, haciendo que los productos finales sean inservibles para el consumo. Esto ocurre aún en casos en que la cantidad de almendras enmohecidas sea muy baja (Urquhart, 1963).

Es normal que las semillas tengan cierta cantidad de moho inofensivo mientras están en las cajas de fermentación o en las primeras etapas del secado, pero éstos no son los mohos que posteriormente causan daño. Los mohos perjudiciales se desarrollan, por lo general, durante el almacenamiento, en los casos en que no se han tomado las debidas precauciones para evitarlos (Urquhart, 1963).

Es probable que estos mohos nocivos aparezcan cuando las semillas no están lo suficientemente secadas, es decir, cuando el contenido de humedad es mayor o igual a 8% y cuando la humedad relativa de la atmósfera alcanza 80%. Una ligera cantidad de moho en el exterior de la testa, no afecta necesariamente los cotiledones, pero durante el almacenamiento, el moho en cualquier forma, es propenso a aumentar. Pocos mohos son capaces de penetrar la testa, una vez que los mohos más agresivos han atravesado la testa, otros seguirán (Urquhart, 1963).

## **6. MICOTOXINAS**

Ciertas especies fúngicas son capaces de producir unos metabolitos secundarios con carácter tóxico llamados micotoxinas. La segregación de estas sustancias se produce bajo ciertas condiciones ecológicas favorable y son capaces de desencadenar cuadros de intoxicación aguda, carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos y estrogénicos (Pittet, 1998).

En 1960 murieron 100.000 pavos de Inglaterra. La mortandad fue asociada con diversos lotes de alimentos, y todos ellos tenían un ingrediente en común, harina de cacahuete de una sola fuente de procedencia. La investigación intensa que se realizó entorno a este problema permitió concluir que la causa de la muerte de las aves era una sustancia producida por el moho *Aspergillus flavus*, por lo que se les llamó aflatoxinas, encontrándose que era una serie de compuestos tóxicos químicamente relacionados, los cuales varían en su grado de toxicidad (Moreno, 1988).

La mayoría de las micotoxinas están producidas por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Claviceps* (Hussein, 2001). Aunque hay unas 300 micotoxinas que han sido aisladas y químicamente caracterizadas, las investigaciones se han centrado en aquellas formas que causan significativos daños al hombre y animales. Estas micotoxinas son las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, patulina, citrinina, toxinas tremogénicas y alcaloides ergóticos, entre otras (Pittet, 1998). Otras micotoxinas también importantes en mohos son: rugulosinas, fusarina C, moniliforminas, fusarina C, moniliforminas, roquefortina C, alternariol, ácido tenuazónico, altertoxinas, xantoascinas, esterigmatocistinas, ácido 3-nitropropiónico, ácido ciclopiazónico, entre otras (Magan y Olsen, 2004).

Debido a sus variados efectos tóxicos y su alta resistencia a los tratamientos térmicos, la presencia de micotoxinas en los alimentos es potencialmente peligrosa para la salud animal y humana (Pittet, 1998). Estas toxinas cuestan millones de euros anualmente en todo el mundo ocasionando pérdidas en la salud humana, en la salud animal y en productos agrícolas que son desechados al ser inaceptables en el comercio nacional e internacional (Shane, 1994).

El tipo y cantidad de sustancias producidas no solo depende de las características de la cepa individual, sino también de las condiciones medioambientales (nutrientes, parámetros fisicoquímicos, etc.). Las condiciones de crecimiento que permiten la toxigénesis son más limitadas

que aquellas que posibilitan el crecimiento del moho. Entre los factores que conducen a la presencia de micotoxinas en los alimentos, hay dos principales categorías (Le Bars, 1998):

1. Factores intrínsecos que dependen de la cepa fúngica: la producción de una determinada micotoxina no está asociada con una especie en particular sino con una cepa en concreto y en algunos casos incluso depende del substrato en que la cepa es aislada.
2. Factores extrínsecos que dependen de las condiciones medioambientales:
  - Actividad agua ( $a_w$ ). La actividad agua influye considerablemente en la producción de toxinas, particularmente en los productos poco hidratados. La mayor parte de los mohos que contaminan los cereales, por ejemplo, necesitan valores superiores a 0,7%.
  - Descenso de la presión parcial de oxígeno. El descenso de la presión parcial de oxígeno y especialmente el incremento del nivel de  $CO_2$  conduce a una más marcada reducción de la toxicogénesis que del crecimiento fúngico.
  - Composición química del substrato. La toxicogénesis, al menos para la mayoría de las micotoxinas conocidas, es más dependiente de la composición química del substrato que el crecimiento fúngico.

- La temperatura. La temperatura óptima para la toxicogénesis, se define la temperatura a la cual el ritmo de producción de toxinas es máximo. Esta temperatura es normalmente ligeramente más baja que la temperatura óptima para el crecimiento del moho. Además el rango de temperaturas que permite una toxicogénesis significativa es más estrecho que la que permite el crecimiento del moho.
- Zonas de microflora. Que son pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad.
- Integridad física del grano o del alimento.

En general, los riesgos para la salud humana y animal por la ingestión prolongada de alimentos con ciertos niveles de micotoxinas están sujetos a varios factores (Anton, 2001):

- Tipo de micotoxina, biodisponibilidad, toxicidad y concentración de la misma en el alimento.
- Sinergismos entre las micotoxinas presentes.
- Cantidad de alimento consumido, y continuidad o intermitencia en la ingestión.
- Peso del individuo, estado fisiológico y edad del mismo.

Las micotoxinas pueden ser producidas bien sea por mohos saprofitos, principalmente durante el almacenaje, o por mohos endofitos, durante el crecimiento de la planta (D'mello, 1997). Los alimentos más

propensos a la contaminación por mohos saprofiticos son los granos y cereales (Pascual, 2005).

Las micotoxinas ejercen su poder tóxico con cantidades relativamente bajas como partes por billón. Son capaces de causar graves enfermedades que afectan al hígado, riñón y órganos formadores de sangre. La composición química de las micotoxinas es diversa, pero tienen en común un peso molecular relativamente bajo que favorece su resistencia a los tratamientos térmicos que se aplican en el proceso de elaboración de algunos alimentos (Pascual, 2005).

Muchos mohos no son productores de micotoxinas incluso pudiendo invadir el grano, por lo que un grano enmohecido no tiene por qué ser necesariamente tóxico. Del mismo modo, puede detectarse una micotoxina sin la presencia del moho productor, ya que éste puede haber sido inactivado por procesos químicos o por alteración de los factores ambientales mientras que las micotoxinas permanecen en el substrato (García, 2002).

El problema de las micotoxinas es mundial, ya que los mohos pueden desarrollarse en cualquier región, aún bajo condiciones climáticas diferentes. Sin embargo, el problema es mayor en algunos países debido a que en ellos las condiciones de temperatura y humedad son más favorables para el crecimiento de mohos y por lo tanto, para la producción de las toxinas (García, 2005).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. MATERIA PRIMA**

Un total de ocho (8) muestras de granos de cacao beneficiados o no, fueron suministradas por diferentes proveedores. Las dos primeras, se designaron como Oderí I y II, y se tomaron para los ensayos preliminares del perfil fúngico. Las mismas correspondían a muestras de granos de cacao “corriente” (sin fermentar y secado naturalmente al sol) provenientes de un galpón de almacenamiento ubicado en la carretera nacional de El Guapo, sector el Cristo, Río Chico, Edo. Miranda. Estas muestras fueron descritas por el proveedor como una mezcla de granos provenientes de la región de Barlovento, Edo. Miranda. No se conoce exactamente la fecha en la que se realizó la cosecha de los frutos, sin embargo, la recepción se realizó en el mes de Julio de 2011, pudiéndose estimar una cosecha cercana a esta fecha (Junio de 2011).

La tercera muestra de cacao corriente estudiada fue suministrada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y se codificó como “INIA” y estaba constituida por una mezcla de granos híbridos procedentes del Campo Experimental Padrón, ubicado en la carretera nacional vía a Oriente, de la parroquia Ribas, sector Tapipa, en el Municipio Acevedo del Edo. Miranda. Este lote fue beneficiado en Diciembre de 2011 y la muestra fue almacenada dentro de cavas de anime en condiciones de refrigeración en el laboratorio.

- **Muestras provenientes de pequeños productores**

La cuarta y quinta muestra fueron codificadas como “El Rosario” y “El Verde”, las cuales fueron suministradas por el productor correspondiente (vocero comprador del sector). Según cada vocero, las muestras fueron cosechadas y beneficiadas entre Julio- Agosto de 2011 en el sector el Rosario y el Verde N° 17, ubicados ambos en la parroquia El Guapo, Municipio Páez, en el Edo. Miranda.

La sexta muestra designada como “El Vigía”, es natural de esta misma zona, es decir, el Vigía, Edo. Mérida, específicamente del sector los Bocadillos, Km. 15, instalaciones Sumandes en el sector. Las mismas se beneficiaron y almacenaron en Diciembre de 2011 en las instalaciones, también fue facilitada por un vocero comprador.

La séptima y octava muestra, fueron denominadas como “Curiepe” y “La Trinidad”, son las más recientemente cosechadas y beneficiadas, siendo para la primera en el mes de Febrero de 2012 y para la última, en Enero de 2012. Son cacao comerciales destinados directamente para la venta, para los pequeños productores y otros proveedores interesados. La primera de estas es proveniente del sector la Vega, parroquia Curiepe, Municipio Brión; y la segunda del sector Corozalito, en la Trinidad, parroquia Santa Cruz de Cúpira, Municipio Pedro Gual, ambas localidades pertenecientes al Edo. Miranda. Estas muestras fueron cosechadas y beneficiadas siguiendo la metodología de trabajo usada por Álvarez y col. (2010).

## **1.1 BENEFICIO Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

El proceso de fermentación para la séptima y octava muestra, es decir, “Curiepe” y “La Trinidad”, 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 aproximadamente comprendido entre 6-8 %. El almacenamiento de las muestras proporcionadas por cada productor se realizó en un lugar fresco y seco, dentro de sacos de yute, ubicado en el laboratorio del INIA y a temperatura ambiente.

## **1.2 TOMA DE MUESTRAS**

Todas las muestras (beneficiadas o no) fueron tomadas siguiendo la norma COVENIN 1339 (1995). El procedimiento se llevó a cabo desde los sacos (50 kg de cacao secado) 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. Aquellas que fueron fermentadas en cajones de madera, (Curiepe y La Trinidad) y secados naturalmente al sol en patios de cemento, fueron colocados en sus respectivos fermentadores para la toma de cinco (5) muestras primarias al azar con una paleta de madera, en distintos puntos del cajón (superior, centro y fondo). La muestra compuesta o final para análisis fue de 2 kg., la cual se obtuvo mezclando y homogenizando las muestras primarias.

### **1.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las muestras de granos enteros beneficiados o no (con testa), se molieron y tamizaron hasta obtener una granulometría de 60 mesh. El polvo de cacao obtenido fue almacenado en bolsas tipo ziploc hasta los análisis fisicoquímicos correspondientes, realizados en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Miranda) y en el CENIAP-Maracay. Para los estudios microbiológicos, se utilizaron granos de cada una de las muestras, las cuales fueron analizadas en el Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos (ICTA).

## **2.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS GRANOS**

### **2.1 PRUEBA DE CORTE DE CALIDAD**

Para determinar la calidad inicial de los granos de cacao fermentados y secados al sol o no fermentados, se procedió a efectuar un análisis visual de las dos caras del cotiledón, para determinar los posibles defectos físicos que puedan presentar los granos, 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.

## 2.2 ANÁLISIS PROXIMAL

Se procedió a realizar el análisis proximal a las diversas muestras de granos de cacao con testa, a fin de evaluar su composición química al momento del análisis microbiológico, utilizando para ello 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 determinó humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda como sigue:

<b>Determinación</b>	<b>Método</b>
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.

## 2.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

A fin de conocer los cambios de los granos de cacao fermentados y secados durante el almacenamiento se procedió a analizar el pH y la acidez por medio de los siguientes métodos:

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

### 3. ANALISIS MICROBIOLÓGICO

Se analizaron seis (6) muestras de granos de cacao corriente (con testa), con bajo índices de fermentación, secados naturalmente al sol y almacenados en sacos de yute (Oderí I, Oderí II, INIA, El Rosario, El Verde y El Vigía). Asimismo, dos (2) muestras adicionales de cacao fermentado, secado y almacenado en condiciones similares a las anteriores (Curiepe y La Trinidad).

#### 3.1 DETERMINACIÓN DEL CONTAJE TOTAL DE MOHOS Y SU IDENTIFICACIÓN

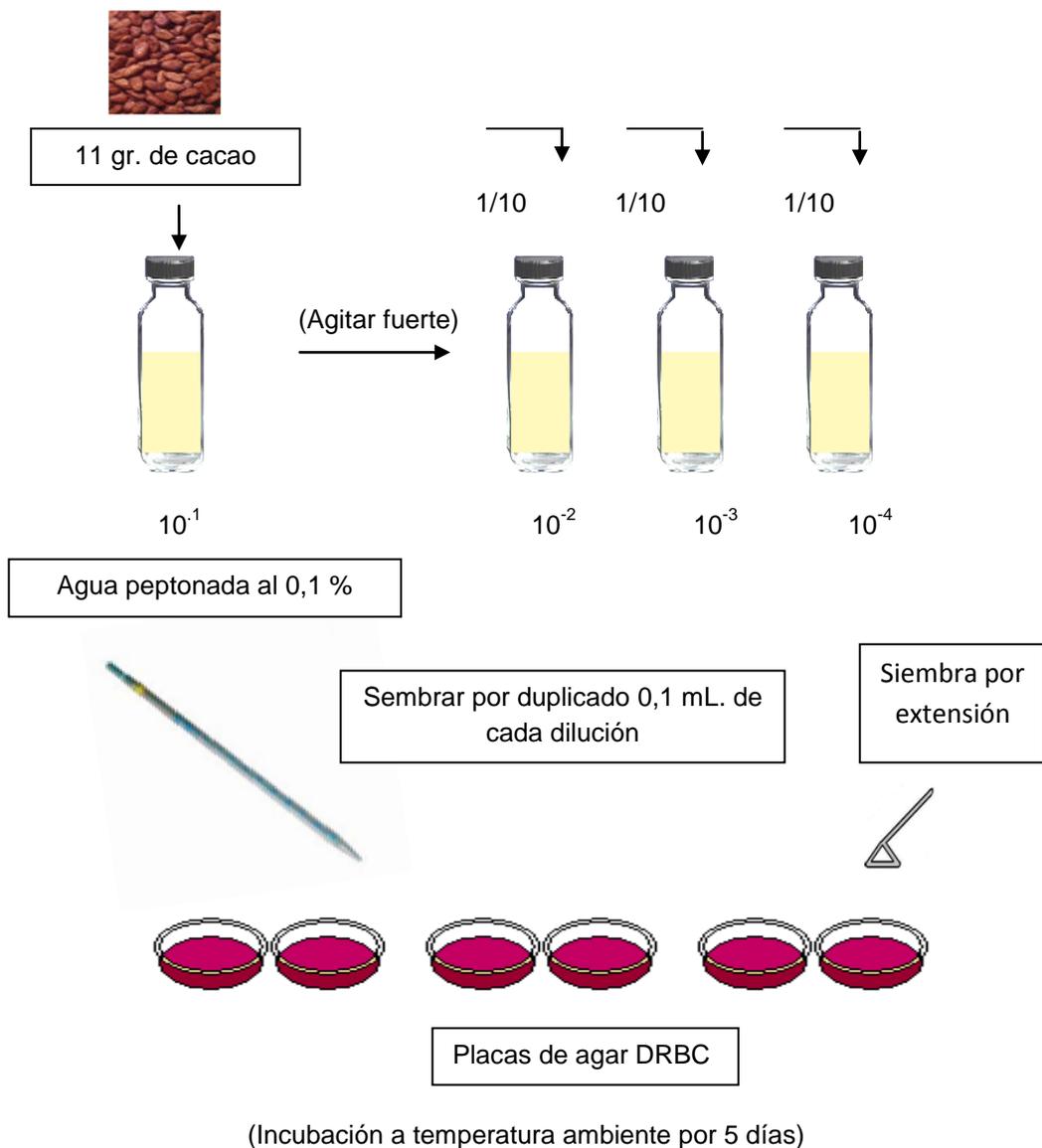
Utilizando la siembra por extensión en superficie se determinó el conteo de mohos totales. Esta técnica básica permite la visualización de la formación de colonias a partir de un número fijo de células viables. Es utilizada, por lo tanto, para obtener conteos de unidades formadoras de colonias (UFC) presente en la muestra analizada (Laneri, 2001).

La aplicación de esta técnica tiene por base el uso de diluciones seriadas, obtenidas a partir del homogenizado de las muestras sólidas, semisólidas o líquidas (Laneri, 2001). Por ende se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  para cada una de las muestras sólidas de granos de

cacao, partiendo de 11 gr. de la muestra (pesados asépticamente) en 99 mL de agua peptonada al 0,1%. Posteriormente se procedió a la siembra de 0,1 mL de cada dilución por duplicado, en placas de DRBC (Diclorán rosa bengala clorafenicol).

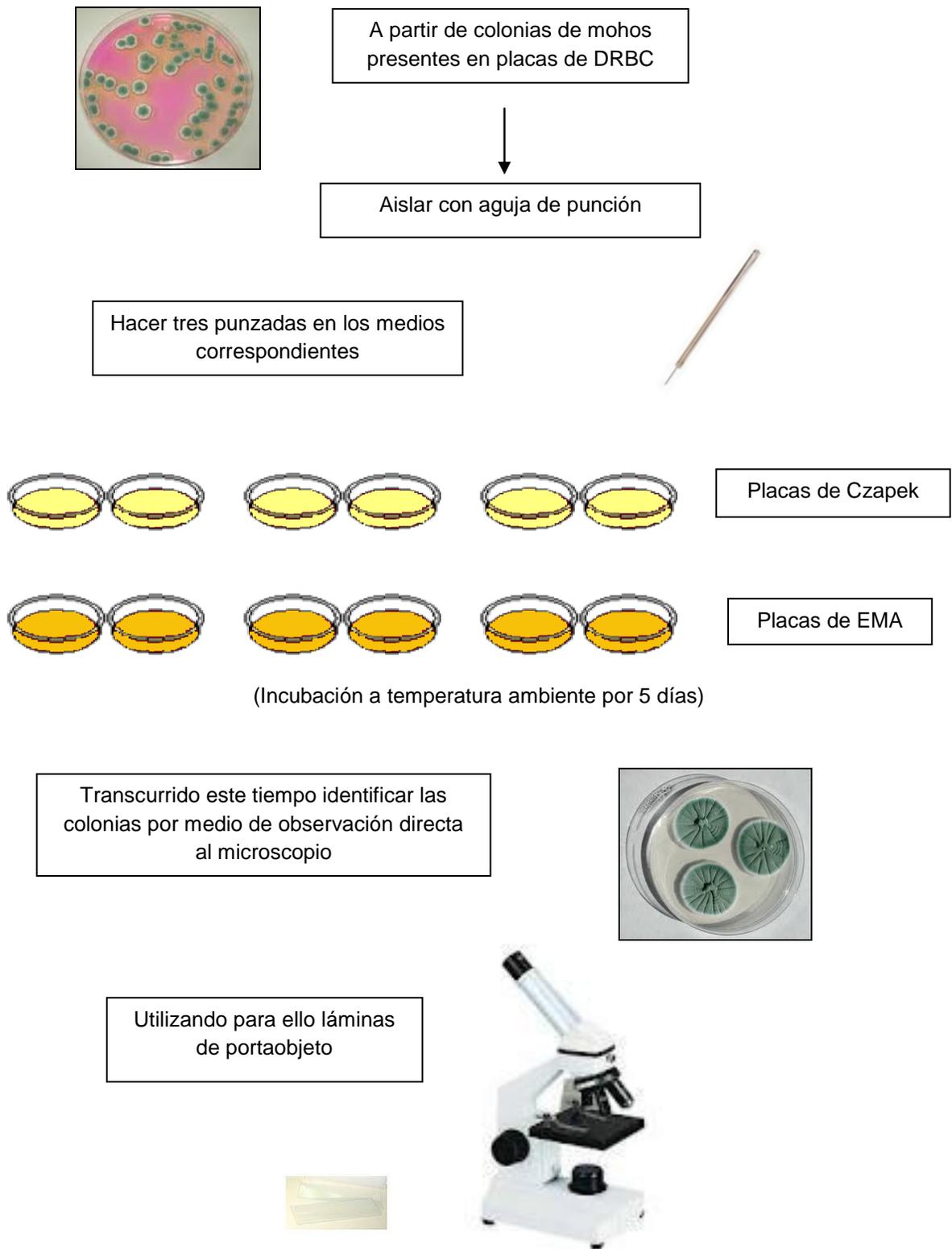
El agar Diclorán rosa bengala clorafenicol, es un medio de cultivo selectivo que está compuesto por glucosa y peptona como base nutritiva. El Rosa de Bengala reduce el crecimiento de bacterias y disminuye la dispersión de las colonias de mohos y levaduras. Esta reducción en el tamaño de las colonias de hongos facilita su recuento y además permite el crecimiento de otras especies con desarrollo más lento. El cloranfenicol aumenta la selectividad del medio, no permitiendo el crecimiento de bacterias. El indicador Rosa de Bengala es absorbido por las colonias de levaduras y mohos facilitando así su reconocimiento y enumeración (Cultimed, 2003).

Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente de 3 a 5 días, para luego realizar el conteo de los mohos, expresando los resultados como unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) (Rengel, 2006).



**Fig. 14. Metodología utilizada para evidenciar la incidencia de mohos en granos de cacao**

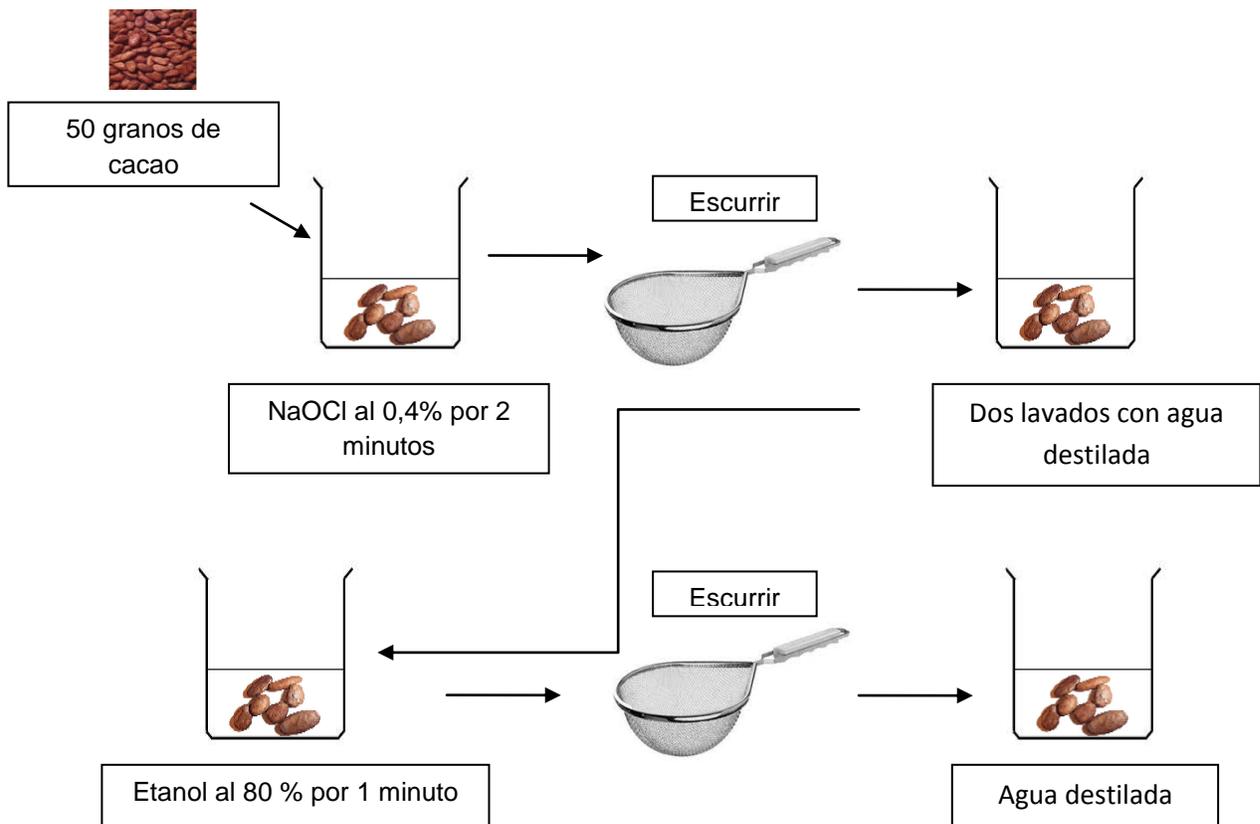
Para la identificación de las especies más abundantes, se procedió a aislar las colonias en placas de agar Extracto de Malta (EMA) y Czapek, para posteriormente clasificarlas según las claves taxonómicas respectivas, basadas en características morfológicas y fisiológicas (Samson, 1995).



**Fig. 15. Metodología utilizada para el aislamiento e identificación de los mohos**

### 3.2 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE COLONIZACIÓN

Se colocaron 50 gramos de cacao en cierta cantidad de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,4 %, de manera que cubriera las almendras completamente, por aproximadamente 2 minutos. Transcurrido este tiempo se escurrieron los granos y se lavaron con agua destilada dos veces sucesivas; posteriormente se sumergieron en cierta cantidad de etanol al 80 % por 1 minuto y se lavaron de nuevo con agua destilada. Al culminar el lavado, se secaron con servilletas estériles. Subsiguientemente se colocaron 4 granos de cacao en cada placa de DRBC y se incubaron por 7 días a temperatura ambiente. Para finalizar, se realizó la determinación del porcentaje de granos colonizados (Rengel, 2006).





Colocar cuatro granos por  
placa de agar DRBC

(Incubación a temperatura ambiente por 7 días)

**Fig. 16. Metodología utilizada para determinar el grado de infestación en granos de cacao**

#### **4. ANALISIS ESTADÍSTICO**

Se calcularon las distintas desviaciones estándares en los experimentos realizados. También se aplicó un ANOVA de una vía, para la observación de diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos determinados, así como para el contaje total de los mohos entre las diferentes muestras. Utilizando para ello el programa estadístico Statgraphics Centurion.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

#### 1.1 PRUEBA DE CORTE

La prueba de corte muestra determinados defectos que causan sabores negativos, y señala el grado de fermentación que tiene efecto sobre el sabor intrínseco de la almendra (Wood y Laas, 1985). La función de la prueba de corte es disminuir el riesgo de que el comprador acepte cacao con graves defectos económicos y, en menor grado, de sabor (Stevenson, 1993). Los resultados para la prueba de corte están reflejados en la tabla 1.

Tabla 1. Prueba de corte de calidad en granos de cacao fermentados y secados

Características	Muestras					
	INIA	El Rosario	El Verde	El Vigía	Curiepe	La Trinidad
% granos planos y partidos	4	6	11	6	5	5
% granos dañados por insectos	0	4	3	5	0	2
% granos pizarrosos	2	0	5	0	0	0
% granos mohosos	0	3	2	4	2	2
% granos germinados	0	0	0	0	0	0
% granos dobles	0	0	0	0	0	2
% granos insuficientemente fermentados	33	36	25	41	12	6
% granos fermentados	61	50	55	44	81	83

Los porcentajes de granos fermentados fueron de 61, 50, 55, 44, 81 y 83% para las muestras procedentes del INIA, El Rosario, El Verde, El Vigía,

Curiepe y La Trinidad, respectivamente. Según lo que señala la norma 50:1995 de la Comisión Venezolana de Normas Industriales, los dos últimos porcentajes entran en el rango de cacao “fino de primera”, ya que se encuentran por encima del 80%, que es límite permitido para esta categoría. Es de hacer notar, que esta misma norma define a este cacao como el formado por granos que han sido sometidos a fermentación, exentos de olores extraños al característico de este grano y de cualquier otro signo de adulteración; por lo que se presume que el proceso fermentativo se realizó apropiadamente para las muestras de Curiepe y La Trinidad.

Asimismo los demás porcentajes corresponden con la clasificación de cacao “fino de segunda” o “corriente”, debido a que se encuentran en un rango menor a 80%; esto indica la posibilidad de un inadecuado o carente proceso fermentativo para las muestras del INIA, El Rosario, El Verde y El Vigía, o una recolecta de la mazorca antes de la madurez del fruto (Guzmán, 2007).

Sin embargo, la clasificación de los granos de cacao no está claramente definida y aceptada universalmente. La distinción entre estas categorías (corrientes y finos) continúa siendo subjetiva y se encuentran muy poco relacionados con los factores geográficos, genéticos, climatológicos, o con alguna vinculación con el proceso de beneficio después de la recolección o cosecha (Manual de productos básicos, 1991).

La norma COVENIN 50:1995 también establece que los granos insuficientemente fermentados son aquellos que al ser cortados longitudinalmente no presentan agrietamientos o estrías, su textura es lisa y compacta en toda la superficie o parte de ella y generalmente la cutícula está muy adherida a los cotiledones. De acuerdo a los resultados obtenidos, se ratifica lo anterior, ya que las dos últimas muestras reflejaron una cantidad de granos insuficientemente fermentados menor al 20%, característico de los granos finos de primera; mientras que el resto estuvo entre 20-80% que es propio de los granos finos de segunda o corrientes.

Con respecto a los granos dobles, la norma COVENIN 50:1995 los detalla como la aglomeración de dos o más granos, unidos firmemente por partes del mucílago debido a una separación defectuosa del mismo. La muestra de La Trinidad fue la única que mostró granos dobles, pero en niveles muy pequeños (2%), por lo tanto, no afecta la calidad del cacao. Por otra parte, el porcentaje de granos germinados fue 0% para todas las muestras analizadas, lo cual significa que durante el almacenamiento no existe riesgo que mohos y/o insectos penetren las semillas por la presencia de hoyos en las cáscaras (Stevenson, 1993).

El porcentaje de granos mohosos, tanto dentro como fuera de la semilla, fue mayor para la muestra procedente de El Vigía, con un 4%. Ahora bien, la norma COVENIN 50:1995 plantea que el límite permisible es de 0-3%, resulta claro que en este caso no se cumple con los requisitos establecidos y existe la posibilidad de que la presencia de mohos dentro de

los cotiledones de cacao destruya totalmente el sabor del grano. Las condiciones que favorecen la aparición de los mismos incluyen germinación, quiebre o corte de granos, entrada de insectos, secado no adecuado y almacenamiento en humedad relativa superior a 85% (Stevenson, 1993). Respecto a las muestras de INIA, El Rosario, El Verde, Curiepe y La Trinidad, se encontró una proporción de granos mohosos de 0, 3, 2, 2, y 2%, respectivamente, de manera que satisfacen las exigencias de la norma.

Se conoce como almendras pizarrosas a aquellas que poseen una coloración gris u oscuro, que indica que no habrá ningún efecto de fermentación y en general, representan un defecto muy serio para cualquier procesador de cacao (Stevenson, 1993). La norma COVENIN 50:1995 expone que el rango aceptado para este parámetro es de 0-3%, por lo cual todas las muestras cumplen con este requerimiento, excepto la muestra originaria de El Verde, que alcanzó un 5%, se corrobora entonces que ciertamente este cacao tuvo un deficiente o ausente proceso fermentativo.

La norma COVENIN 50:1995 instituye que los granos dañados por insectos son aquellos en cuyo interior o exterior se detectan insectos en cualquier fase de desarrollo (huevos, larvas, adultos) o que han sido atacados por los mismos de manera que han dañado la almendra en forma visible. Cabe resaltar que el límite permitido para ello es de 0-3%. El porcentaje de semillas defectuosas fue de 4% para la muestra de El Rosario y 5% para El Vigía, lo cual es inadecuado, ya que se encuentra por encima de lo que estipula la norma. Es lógico pensar entonces que en estos casos

hubo un almacenamiento incorrecto, que dio acceso a la entrada de insectos. Para las muestras procedentes del INIA, El Verde, Curiepe y La Trinidad, se halló un porcentaje de granos afectados por insectos de 0, 3, 0 y 2%, respectivamente; que son valores admitidos y que son ejemplos de un aparente controlado almacenamiento.

De acuerdo a la misma norma, el porcentaje de granos planos y partidos son aquellos en el cual los dos cotiledones son muy finos y les falta algún fragmento, el rango aceptado es 0-3%. Se evidencia que todas las muestras presentaron porcentajes elevados, con valores mayores a los enunciados en la COVENIN. La muestra de INIA fue la que se acercó al límite superior (con 4%). Es de acotar que estos granos son inútiles para la producción de chocolate, ya que el grano casi no contiene cotiledones y mucho de su peso es cascarilla. Además, el origen aplanado puede ser debido a la cosecha de mazorcas no maduras y/o fermentación ineficiente (Stevenson, 1993).

Es importante resaltar que la prueba de corte tiene muy baja precisión y es una medida subjetiva por las siguientes razones: involucra la evaluación visual de los cambios de color en los granos, la oxidación de los tejidos del grano hace que los colores internos cambien naturalmente, la infección de las semillas por algunos microorganismos, como *Phytophthora* o *Monilia*, puede resultar en un color marrón o café, difícil de distinguir de las almendras fermentadas (Stevenson, 1993).

Además los criterios físicos que se utilizan para evaluar la calidad de los granos de cacao en términos de color, tamaño, grosor, fisura o resquebrajamiento no son suficientes, pues el criterio final de su calidad lo da el sabor y aroma (Despreaux y col., 1996).

De igual manera Rohan (1964), encontró que las características físicas de los granos fermentados y secados son difíciles de definir con precisión, ya que están enmarcados en criterios subjetivos y las exigencias de los empresarios varían de acuerdo con los mercados que los abastecen y de la demanda de materia prima.

## **1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL**

El análisis proximal probablemente sea el método más usado para expresar la calidad nutritiva global de un alimento. Mide la cantidad de nutrientes presentes como: contenido de humedad (agua), proteína cruda, fibra cruda, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda) y carbohidratos. Se expresa en porcentaje y se aplican metodologías específicas para evaluar cada uno de los componentes (Barrera y col., 2004). En atención a lo expuesto, los resultados de composición química proximal de las distintas muestras de granos de cacao fermentados y secados, se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2. Composición química proximal en granos de cacao fermentados y secados**

<b>Muestras</b>	<b>Humedad (%)*</b>	<b>Cenizas (% b.s) *</b>	<b>Proteína cruda (N x 6,25) % b.s*</b>	<b>Grasa cruda (% b.s) *</b>	<b>Fibra cruda (% b.s) *</b>	<b>Otros Carbohidratos (%)*</b>
<b>INIA</b>	5,15 ±0,20 a	4,50 ±0,00 d	16,49 ±0,12d	40,49 ±0,24a	18,06±0,02f	15,71± 0,65a
<b>Rosario</b>	6,24 ±0,51 bc	3,75 ±0,04 a	14,28 ±0,12a	42,11 ±0,27b	16,43±0,32e	17,19 ±0,62bc
<b>Verde</b>	6,30 ±0,31 c	4,05 ±0,26 bc	15,38±0,14bc	42,14 ±0,11b	15,40±0,12c	16,72 ±0,57b
<b>Vigía</b>	5,69 ±0,06 ab	4,09 ±0,07 c	14,27 ±0,01a	45,10 ±0,09d	15,71±0,17d	15,13 ±0,21a
<b>Curiepe</b>	5,54 ±0,40 a	4,03 ±0,03 bc	15,22 ±0,18b	45,50 ±0,22e	12,90±0,09b	16,15 ±0,33b
<b>Trinidad</b>	5,62 ±0,04 a	3,90 ±0,01 ab	15,56 ±0,19c	44,68 ±0,16c	12,58±0,07a	17,66 ±0,01c

\*Promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

### **1.2.1 HUMEDAD**

La humedad es una importante variable física que se refiere al contenido de humedad de los granos y al contenido de humedad del medio en donde se encuentran los granos almacenados (Álvarez, 1998). El contenido de humedad de los granos incluye las cuatro formas en la que el agua está ligada al alimento (capilar, en solución, absorbida y de composición) (Belitz y Grosch, 1988).

La norma COVENIN 50:1995 señala que el contenido de humedad de lotes de granos de cacao que se comercialicen no debe ser mayor del 8% en peso. Si se observa los resultados de la tabla 2, resulta claro que los valores oscilan entre 5,15- 6,30%, específicamente el contenido de humedad más bajo fue para la muestra del INIA (5,15%) y el más alto para la procedente de

El Verde (6,30%). Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) se halló que no hay diferencias significativas en el contenido de humedad entre las muestras, exceptuando la de El Rosario y El Verde.

Desde la antigüedad se ha reconocido que los alimentos con mayor contenido de humedad son los más perecederos, de tal manera que el control en el contenido de humedad de un producto es una herramienta para su conservación (Maupoey, 2001).

El contenido de humedad es el factor de mayor importancia en el comportamiento del grano en el manejo postcosecha, en especial durante su almacenamiento y procesamiento. El alto contenido de agua es uno de los factores que puede causar pérdidas en estos productos. Su control inadecuado en las operaciones de postcosecha, puede producir calentamiento de la masa de grano, así como generar focos de hongos e insectos (Ospina, 2002).

En este marco de ideas, se tiene que la humedad en estos granos de cacao es tolerable y adecuada para no permitir la proliferación de microorganismos indeseables como los mohos. En lo que respecta al almacenamiento, este proceso no afectó la humedad de las muestras; ya que si las condiciones de manejo y almacenamiento de lotes de cacao no son las más apropiadas, se producirán cambios en el contenido de agua; de allí que en los almacenes se debe controlar la humedad relativa ambiental, de la

temperatura, del contenido de agua de los granos y el control de las infecciones por insectos y hongos (Reyes y Reyes, 2000).

Es importante destacar que la humedad inicial de la almendra de cacao varía en función a la época de cosecha o tiempo que transcurra desde la cosecha hasta la apertura de las mazorcas (Rodríguez y Rojas, 2000). En función de los resultados, es lógico pensar que esto no influyó en la calidad de los granos.

En un estudio realizado por Álvarez (2008), se obtuvo un rango de humedad para cacao fermentado y secado entre 5,43- 6,61%, con un promedio de 6%; lo cual está acorde con lo conseguido en este trabajo e igualmente satisfacen las exigencias de la norma COVENIN 50:1995. Un resultado similar consiguió León (2012), para granos de cacao fermentados y secados, con valores de humedad entre 6,9 -8,07%.

### **1.2.2 CENIZAS**

Las cenizas representan la fracción correspondiente a los minerales del alimento, para ello toda la materia orgánica del alimento es incinerada y sólo quedarán los compuestos inorgánicos (Caravaca, 2003). El contenido de minerales en cacao es de importancia nutricional y fisiológica, debido a la presencia de niveles significativos de potasio, magnesio, calcio y en pequeñas concentraciones de hierro (Álvarez, 1998).

De acuerdo con los resultados reportados en la tabla 2, los valores de cenizas en base seca se hallaron entre 3,75- 4,50%, siendo la cifra más baja para la muestra de El Rosario (3,75%) y la más alta para la de INIA (4,50%). Al efectuar el ANOVA se descubrió que no hay diferencias significativas en cuanto a cenizas entre las muestras de El Rosario y La Trinidad.

Ospina (2002), señala que el contenido de cenizas en 100 gramos de parte comestible de cacao es de 3,8 gr., lo que es igual a 3,8%, lo cual supera las cifras logradas en esta investigación, con excepción de la muestra de El Rosario. En estudios efectuados por Guzmán (2007), se registraron contenidos de cenizas inferiores a los de este trabajo (2,18%), en muestras de cacao fermentados y secados. Por otra parte, León (2012), encontró un contenido de cenizas más elevado (entre 4,08- 4,82%), en granos de cacao fermentados y secados.

Por tanto, posiblemente las variaciones halladas en las muestras se deban a la eficacia de los tratamientos postcosecha aplicados por los diferentes proveedores en las zonas correspondientes. En virtud a lo expuesto, Moreno y col. (1991), expone que las causas de las variaciones que afectan los parámetros físicos y químicos de los granos de cacao, están en función con el tiempo de fermentación y secado. A ello se agrega que no se conoce con certeza la influencia que tienen los meses de cosecha sobre las posibles diferencias en el contenido de minerales en granos fermentados y secados (Alvarado, 1990).

### 1.2.3 PROTEÍNA CRUDA

En el transcurso de la fermentación ocurre una disminución de las proteínas, siendo estas hidrolizadas por las proteasas que dan lugar a la proteólisis, lo que lleva a la formación de oligopéptidos y aminoácidos libres (Pettipher, 1990).

Los resultados obtenidos (disponibles en la tabla 2) revelaron valores para este parámetro en base seca entre 14,27-16,49%, donde la cifra más pequeña corresponde a la muestra de El Vigía y la más grande pertenece al INIA. Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) se determinó que hay diferencias significativas en el contenido de proteínas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

Según Kalvatchev y col. (1998), el contenido de proteínas en granos de cacao debe ser de 12 gr. por cada 100 gr. de muestra, es decir, 12%. Por lo que los porcentajes alcanzados en este análisis son superiores a lo que plantea dicho autor. A raíz de las anteriores afirmaciones Guzmán (2007), logró una cantidad de proteína cruda en semillas de cacao entre 11,08 y 12,46%.

No obstante, en investigaciones realizadas por Lares (2007) y Rodríguez (2007), se obtuvieron porcentajes de proteína entre 12,41 y 13,04%. También León (2012), determinó un contenido de proteína entre 12,93 y 15,50% en granos de cacao. A ello se agrega los resultados de Ortiz y col. (2009), quienes reportaron una proporción de proteínas para granos de

cacao forastero de 14,32% y para cacao criollo de 16,26%. Todas estas cifras anteriores se asemejan más a las encontradas en este trabajo.

Definitivamente, es posible que las diferencias halladas sean dependientes de los caracteres genéticos de las plantas de donde fueron cosechados los frutos de cacao y/o de la efectividad de las técnicas aplicadas durante el beneficio de los granos; ya que Sánchez (1995), dice que la calidad de los granos de cacao comerciales está relacionada con el genotipo y al mecanismo de beneficio.

#### **1.2.4 GRASA CRUDA**

La manteca de cacao constituye la materia grasa contenida en los granos de cacao (Martínez, 2005). Durante la fermentación las grasas aumentan en un 4% en base seca, a partir del quinto día de fermentación, por razón de la pérdida de los cotiledones. Realmente no es mucha la pérdida total de grasa pero algo se traslada a la testa particularmente durante el secado al sol, que derrite la grasa (Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1957).

La grasa o manteca es el mayor constituyente encontrado en el cacao y tiene gran importancia en la industria alimentaria, ya que posee características físicas y químicas, que son muy convenientes en la manufactura de una gran variedad de productos en las industrias chocolateras, cosméticas y farmacéuticas. No siendo comparables con otras grasas de origen vegetal (Guzmán, 2007). Debido a la importancia que la

grasa o manteca de cacao tiene en la manufactura del chocolate en términos económicos, las fábricas buscan el cacao que posee el más alto contenido de grasa, con preferencia a valores superiores a 56% (Red de Generación y Transferencia de Tecnología en Cacao, 1989).

Ospina (2002), señala que el contenido de grasas en 100 gramos de parte comestible de cacao es de 43,7 gr., lo que es igual a 43,7%. En torno a ello los resultados logrados en base seca (ver tabla 2), se encuentran en un rango de variabilidad entre 40,49-45,50%, donde la cifra más baja (40,49%) es para la muestra del INIA y la más alta (45,50%) corresponde a Curiepe, lo cual se relaciona con lo dicho por el autor. Al efectuar el ANOVA se encontró que hay diferencias significativas en cuanto a este factor entre las muestras ( $p < 0,05$ ). León (2012), consiguió valores similares al reportar un rango comprendido entre 39,05- 41,39% en granos de cacao.

Por su parte Álvarez (1998), observó que en granos de cacao de la zona de Chuao los contenidos de grasa fueron de 52,25% y para muestras provenientes de Cuyagua de 56,29%. De la misma manera Guzmán (2007), halló una proporción de grasa en granos de cacao entre 53,91-55,23%. También Ortiz (2009), indicó en cuanto a grasa cruda para granos de cacao criollo un contenido de 54,49% y para cacao forastero 54,08%. Siendo todos los valores anteriores superiores a los encontrados en la presente investigación.

Puede atribuirse que las variaciones en los contenidos de grasa, se deban a las condiciones fisiológicas de la planta, genotipos, condiciones climáticas y/o época de cosecha. Además, los mohos de las almendras de cacao juegan un rol importante, ya que degradan las grasas por acción de enzimas, las cuales incrementan los niveles de ácidos grasos libres, mientras disminuyen los de las grasas. Es por ello que las condiciones de almacenamiento deben ser eficaces, para evitar que las almendras queden expuestas a estos microorganismos (Hardy, 1961).

### **1.2.5 FIBRA CRUDA Y OTROS CARBOHIDRATOS**

El cacao altamente utilizado en la industria agroalimentaria, posee fibra como uno de sus elementos constituyentes, el cual podría ser funcional para el mantenimiento de la salud humana y en la prevención de determinadas enfermedades, como las cardiovasculares y/o el cáncer; ya que tiene una elevada capacidad antioxidante derivada de su contenido en compuestos fenólicos (Lecumberri y col., 2006).

Si se observan los resultados para fibra cruda en base seca en la tabla 2, estos se encuentran en un amplio rango de variabilidad comprendido entre 12,58% y 18,06%, donde el valor más bajo es para la muestra de La Trinidad, mientras el más alto para la del INIA. En cuanto a ello Lares (2007), indicó valores de fibra cruda en muestras de cacao de la región de Chuao entre 17,47% y 18,46%, lo cual corresponde con lo reportado en este estudio.

Para finalizar este punto, se resaltarán los resultados para “otros carbohidratos” referidos en la misma tabla. Es de hacer notar que las cifras se encuentran entre 15,13-17,66%, donde la primera de estas es para la muestra procedente de El Vigía y la última para La Trinidad.

Lo expuesto anteriormente se iguala a los valores logrados por León (2012), en el que indicó un rango para otros carbohidratos en granos de cacao entre 13,63% y 16,84%, con excepción de las muestras de El Rosario y La Trinidad que sobrepasan el límite superior del autor anterior. Al igual que con los componentes químicos previos, quizás las discrepancias se deban a los caracteres genéticos de los granos de cacao y/o a la época de cosecha, entre otros. Para ambos parámetros y mediante el análisis estadístico ANOVA, se halló que hay diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ) para cada caso.

### **1.3 pH Y ACIDEZ TITULABLE**

Durante la fermentación tanto la pulpa como los cotiledones tienen cambios muy importantes en el pH. En general los cotiledones tienen un pH inicial de 6,6. Durante el primer día de fermentación disminuye lentamente hasta 6,3, pero durante el tercer y cuarto día decrece rápidamente, hasta alcanzar un valor de 4,75 aproximadamente, este valor sufre muy pocos cambios hasta que se termina la fermentación. Luego durante el secado va subiendo en forma lenta, llegando hasta 5,4. El pH de la pulpa, en cambio, se inicia muy bajo, favoreciendo cierto tipo específico de microorganismos; su

valor fluctúa alrededor de 3,8. Durante los tres primeros días de fermentación, su valor sube lentamente hasta llegar a 4, pero al cuarto día el valor de pH es 4,75. Durante el resto de la fermentación y secado, tienen un aumento lento, que termina alrededor de 5,2 (Enríquez, 1985).

Portillo y col. (2005) y Torres (2001), mencionan que la constante elevación de pH de la pulpa durante la fermentación, se debe a la desamiliación del contenido de ácido cítrico por las levaduras y las bacterias lácticas. La aparición de las bacterias acéticas se da en primer lugar en las zonas superficiales de las masas de fermentación y en mayor número que en el centro, por lo que es de esperarse que el cambio de pH se produzca más rápidamente en la superficie. De la misma manera Meyer y col. (1989), destacan que la descomposición microbiana de la pulpa produce ácidos acéticos y lácticos, que son difundidos hacia el cotiledón, lo cual incrementa la acidez. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 3.

**Tabla 3. pH y acidez total titulable en granos de cacao fermentados y secados**

<b>Muestras</b>	<b>pH*</b>	<b>Acidez total titulable (% b.s)*</b>
<b>INIA</b>	5,67 ± 0,03 b	1,32 ± 0,01 d
<b>El Rosario</b>	5,54 ± 0,02 a	1,28 ± 0,01 c
<b>El Verde</b>	6,00 ± 0,03 c	0,82 ± 0,01 a
<b>El Vigía</b>	6,43 ± 0,03 d	0,87 ± 0,01 b
<b>Curiepe</b>	6,00 ± 0,01 c	0,81 ± 0,01 a
<b>La Trinidad</b>	6,00 ± 0,02 c	0,82 ± 0,01 a

\* Promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

Puede observarse que las cifras para el pH oscilan entre 5,54-6,43, siendo la cifra más pequeña para la muestra de El Rosario y la más grande para El Vigía. Ahora bien, en cuanto a la acidez total titulable se tiene un rango entre 0,81-1,32%, donde 0,81% corresponde a la muestra de Curiepe y 1,32% a la del INIA. Luego de realizar el ANOVA, se determinó que hay diferencias significativas entre las muestras para ambos parámetros, debido a que  $p < 0,05$ .

En un análisis realizado por Ortiz y col. (2009), se reportó un pH de 6 para cacao criollo y 6,2 para cacao forastero, mientras que la acidez fue de 0,73 y 0,65 para los mismos tipos de cacaos, respectivamente. El primer parámetro se asemeja a lo indicado en la tabla 3, mientras que la acidez está un poco por debajo. Además Álvarez y col. (2010), encontraron un valor promedio de pH de 5,55 y un porcentaje de acidez de 0,41% en granos de cacao. Para este caso tanto el pH como la acidez fueron inferiores a los de esta investigación, exceptuando la muestra de El Rosario que alcanzó un pH de 5,54.

En concordancia con lo anterior Graziani y col. (2003), realizaron un estudio donde se comprobó un pH igual a 5,49 para granos de cacao beneficiados en fermentadores cuadrados y 5,84 en fermentadores rectangulares, además el porcentaje de acidez logrado fue de 0,86% y 0,45%, para semillas procesadas en fermentadores cuadrados y rectangulares, respectivamente. Los resultados de pH se relacionan a lo presente, igualmente para la acidez en el caso de fermentadores cuadrados,

ya que para los granos beneficiados en fermentadores rectangulares la cifra alcanzada fue inferior a lo indicado en este análisis.

Todas estas diferencias podrían atribuirse a la variabilidad genética de la zona a la cual pertenecen los granos y a la aplicación de metodologías distintas para el beneficio, entre otras (Álvarez y col., 2010).

## 2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

### 2.1 RECuento DE MOHOS TOTALES EN MUESTRAS DE CACAO CORRIENTE (NO FERMENTADAS Y SECADAS)

Los resultados obtenidos para las muestras de cacao corriente (sin fermentar y secadas), se encuentran registrados en la tabla 4.

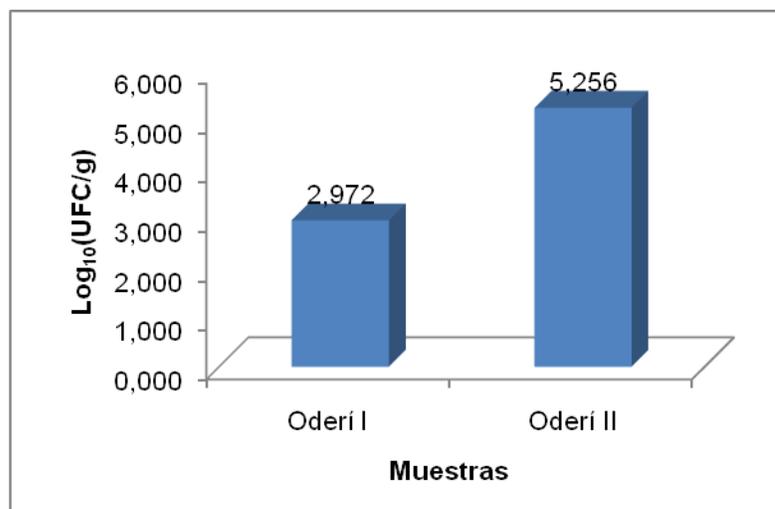
**Tabla 4. Contaje total de mohos en granos de cacao corriente (sin fermentar y secados), almacenados bajo las mismas condiciones**

Muestras	Oderí I	Oderí II
$\text{Log}_{10}(\text{UFC/g})$ *	2,972 ± 0,523 a	5,256 ± 3,616 a

\*Promedio de dos réplicas ± la desviación estándar. Las letras indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

Es de hacer notar que el cacao de ambas muestras, está formado por una mezcla de granos de toda la región de Barlovento. Es comprado (ya beneficiado o no), a productores independientes y luego almacenado por la empresa Oderí, en un galpón con condiciones no adecuadas para alojar granos de cacao, por lo que se esperaba que la contaminación fúngica fuese elevada en los dos casos. No obstante, esto no fue así; en la muestra

señalada como Oderí I el contaje de mohos fue de 2,972 Log<sub>10</sub> (UFC/g), mientras que en la muestra Oderí II fue 5,256 Log<sub>10</sub> (UFC/g). Esto es visible en la figura 17.



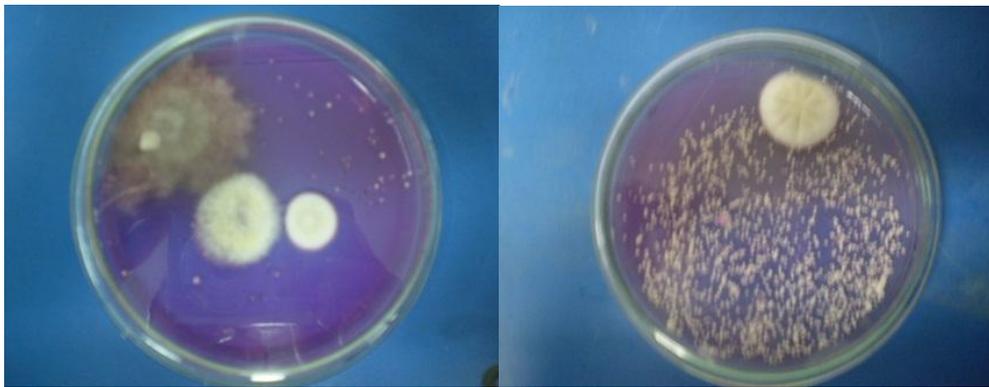
**Fig. 17. Niveles de mohos en granos de cacao corriente (sin fermentar y secados) de dos variedades, almacenados bajo las mismas condiciones**

En vista de los resultados obtenidos, posiblemente los granos tomados para la muestra Oderí II estaban más contaminados que los escogidos para la muestra Oderí I. No obstante, deben considerarse otros factores que posiblemente intervinieron, como las malas prácticas agronómicas durante el beneficio y la época de cosecha, de la cual no se tiene conocimiento preciso (Jones, 1981). Igualmente también sería relevante conocer las características fisicoquímicas de estos granos mediante análisis en el laboratorio, pero dicho estudio no se realizó.

En torno a las desviaciones estándares se reportó 0,523 y 3,616, para las muestras Oderí I y II, respectivamente. Para esta última se estima que la

distribución de los mohos en el saco de granos de cacao no fue homogénea, de allí una desviación tan grande. Para la primera muestra el valor fue menor al anterior, por lo que la distribución de estos microorganismos debió ser más homogénea. Al aplicar el ANOVA se encontró que había diferencias significativas entre las muestras para el conteo total de mohos ( $p > 0,05$ ).

En la figura 18, se evidencia el crecimiento de mohos para la siembra en placas de agar DRBC realizada a partir de granos de cacao de Oderí I.



**Fig. 18. Recuento de mohos en placas de agar DRBC para la muestra Oderí I**

En una publicación realizada por Helfenberger (1964), se estudió la pérdida de peso del cacao beneficiado bajo sistemas diferentes, incluyendo el secado directamente sin fermentación. No se pudo encontrar ninguna diferencia en las pérdidas de peso entre cacao fermentado y secado, y cacao secado sin fermentar.

Generalmente se está de acuerdo en que el chocolate preparado de cacao sin fermentar no posee ni el sabor ni el aroma verdadero del chocolate (Hardy, 1961). Dicho de otro modo, en el cacao no fermentado no hay sabor

a chocolate, ya que durante la fermentación se forman los compuestos precursores del sabor. Son cacaos ácidos y con mucha astringencia (Lambert, 1996). La textura es como de queso y los cotiledones se adhieren a la testa y entre sí. La testa es coriácea y difícil de eliminar. Por otra parte, el color de las almendras es azul-gris moteado o pizarreño (Hardy, 1961).

A raíz de los resultados reportados y las anteriores afirmaciones se considera que las diferencias entre cacao fermentado y secado, y sin fermentar y secado, radican en la textura, sabor, aroma, coloración interna del grano, entre otras. Existe la misma probabilidad de que estos ejemplares sean infectados por mohos y con igual intensidad, ya que esto no depende del proceso fermentativo como tal, sino de las buenas condiciones aplicadas durante el almacenamiento. A ello se agrega lo dicho en el marco teórico por Urquhart (1963), el cual expone que es normal que las semillas tengan cierta cantidad de moho durante la fermentación o en las primeras etapas del secado, pero los mohos perjudiciales se desarrollan durante el almacenamiento.

Finalmente este cacao no fermentado no puede clasificarse como cacao “de primera”, porque no posee el sabor y aroma del verdadero chocolate, es considerado como “fino de segunda” o corriente (Enríquez, 1985).

## 2.2 RECuento DE MOHOS TOTALES EN MUESTRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECADAS O NO

Los resultados correspondientes al recuento de mohos totales para muestras fermentadas y secadas pueden apreciarse en la tabla 5.

**Tabla 5. Contaje total de mohos en granos de cacao fermentados y secados en diferentes zonas del Estado Miranda**

<b>Muestras</b>	<b>Log<sub>10</sub>(UFC/g) *</b>
<b>INIA</b>	3,649 ±0,223 a
<b>El Rosario</b>	4,628 ±2,190 ab
<b>El Verde</b>	4,327 ±0,527 a
<b>El Vigía</b>	6,980 ±1,179 b
<b>Curiepe</b>	5,540 ±0,337 ab
<b>La Trinidad</b>	5,604 ±0,342 ab

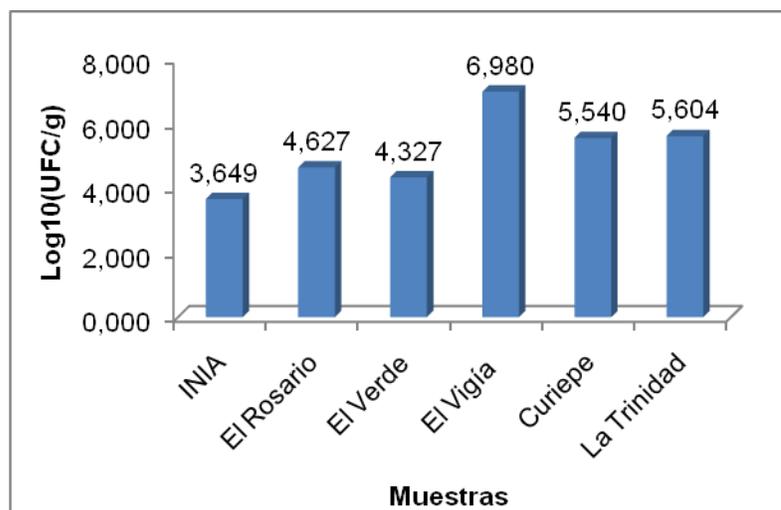
\*Promedio de dos réplicas ± la desviación estándar. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

Al respecto se tiene que la muestra procedente de El Vigía fue la que presentó mayor proliferación de mohos en placas con 6,98 log<sub>10</sub> UFC/g, este resultado era de esperarse, ya que el porcentaje de mohos obtenido por medio de la prueba de corte, para este caso fue el más elevado (4 %). A lo anterior se adiciona que la misma estuvo en almacenamiento sólo un mes en las instalaciones del proveedor, antes de ser recibida en el INIA para su muestreo y otros análisis, de allí pues que esta etapa del procesamiento no fue adecuada.

Ahora bien, las muestras de La Trinidad, Curiepe y El Rosario, mostraron un crecimiento de mohos menor al mencionado en el párrafo

anterior, e igual a 5,604, 5,540, y 4,628  $\log_{10}$  UFC/g respectivamente. Aún así fueron estadísticamente iguales ( $p>0,05$ ) a las de El Vigía.

Finalmente, con la menor incidencia estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) se tiene las muestras del INIA y la de El Verde, con 3,649 y 4,327  $\log_{10}$  UFC/g. Por tanto, en el caso de la primera se presume que por mantenerse en refrigeración durante su almacenamiento, las bajas temperaturas controlaron la proliferación de los mohos. Además la prueba de corte confirma este resultado al reportarse 0% de granos mohosos. De acuerdo con lo anterior, la temperatura del almacén es también un factor importante para la proliferación de mohos en granos de cacao (Christensen, 1978). Estos resultados pueden ser más claros en la figura 19.



**Fig. 19. Niveles de mohos en granos de cacao fermentados y secados en diferentes zonas del Estado Miranda**

Cabe destacar que las desviaciones estándares para las muestras de El Rosario y El Vigía fueron las más elevadas, 2,19 y 1,179, respectivamente;

lo que indica que la distribución de los mohos en los sacos para el almacenamiento de dichos granos no es homogénea. Esto es posible porque se está manipulando muestras sólidas y no líquidas, en donde la distribución de microorganismos debería ser más uniforme. Para las otras muestras las desviaciones son más pequeñas: 0,527 El Verde, 0,342 La Trinidad, 0,337 Curiepe y 0,223 el INIA. Ahora bien, al efectuar el ANOVA de estas últimas se demostró que no había diferencias significativas entre las muestras para el conteo total de mohos ( $p > 0,05$ ).

Es preciso añadir que para evitar la aparición de los mohos en granos de cacao es necesario disponer de almacenes bien ventilados, así como aislar los sacos del suelo por medio de capas de madera de grosor adecuado, y estibar los sacos de modo que no toquen las paredes. Es obvio que en los climas húmedos no es conveniente almacenar cacao por mucho tiempo, cuando esto se hace necesario se debe recurrir al uso de forros de polietileno en los sacos (Urquhart, 1963). En torno a esto, no se conocen las características precisas de los almacenes de todos los proveedores, ni las medidas exactas tomadas para controlar este proceso en cada caso.

Dentro de este enfoque, las almendras germinadas están particularmente expuestas a la entrada de los mohos, sin embargo, el análisis de la prueba de corte ratificó que ninguna de las muestras estaba germinada, por lo que se descarta esta posibilidad para justificar la presencia de los mohos.

Las almendras con testa rota, debido a cortes producidos en el pericarpio al abrir la mazorca o a su agrietamiento por un manejo poco cuidadoso después del secado, están expuestas a la mayoría de los daños que afectan a los granos germinados, como por ejemplo el acceso a los mohos (Urquhart, 1963). En virtud a lo expresado por el autor, y tomando en cuenta los resultados de la prueba de corte, se puede decir que para las muestras de El Rosario, El Verde, El Vigía, Curiepe y La Trinidad, la presencia de granos partidos fue una de las cosas que intervino en la contaminación con mohos, ya que la prueba de corte reveló que las mismas tenían un porcentaje por encima del límite indicado por la norma COVENIN 50:1995.

Al mismo tiempo, los granos atacados por insectos, deterioran igualmente la calidad del grano, ya que son contaminadas más fácilmente por los mohos (Enríquez, 1985). Evidentemente las muestras originarias de El Rosario y El Vigía, fueron las que mostraron el más alto porcentaje de granos dañados por insectos a través de la prueba de corte, de manera que esta podría ser otra condición que favoreció la invasión de estos microorganismos en dichos granos de cacao.

En esta misma dirección los mohos no se desarrollan cuando el contenido de humedad de las almendras es inferior al 8 %, que es el factor crítico (Enríquez, 1985). La humedad relativa de equilibrio tiene importancia en el contenido de humedad del grano, pues indica la disponibilidad de humedad para el desarrollo de macro y microorganismos y funciones

metabólicas en el grano. El cacao fermentado y secado, es suficientemente higroscópico para alcanzar un contenido de agua superior al 8 %, por eso la humedad relativa del aire en donde se almacenan debe mantenerse por debajo de 70% (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias , 1993).

En este contexto no se conocen las humedades relativas de los almacenes, pero es evidente que ello no alteró las propiedades de los granos, ya que los porcentajes de humedad reportados en la tabla 2 cumplieron con el criterio de la COVENIN 50:1995, de manera que no se atribuye la incidencia de los mohos con la humedad de las muestras y de los almacenes de los distintos proveedores.

### **2.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS MOHOS PRESENTES EN GRANOS DE CACAO**

Después del recuento de mohos totales se procedió al aislamiento de todos los tipos morfológicos distintos de colonias fúngicas presentes en las placas (Pascual, 2000). A través de la experiencia de algunos investigadores se han probado diferentes medios y técnicas para aislar e identificar a los mohos que comúnmente invaden a granos de cereales y otros alimentos (Moreno, 1988). La técnica empleada en este trabajo consistió en tomar algunas esporas de las colonias típicas de mohos, usando para ello una aguja estéril, y posteriormente haciendo tres puntos de punción en placas invertidas de agar extracto de malta (EMA) y Czapek.

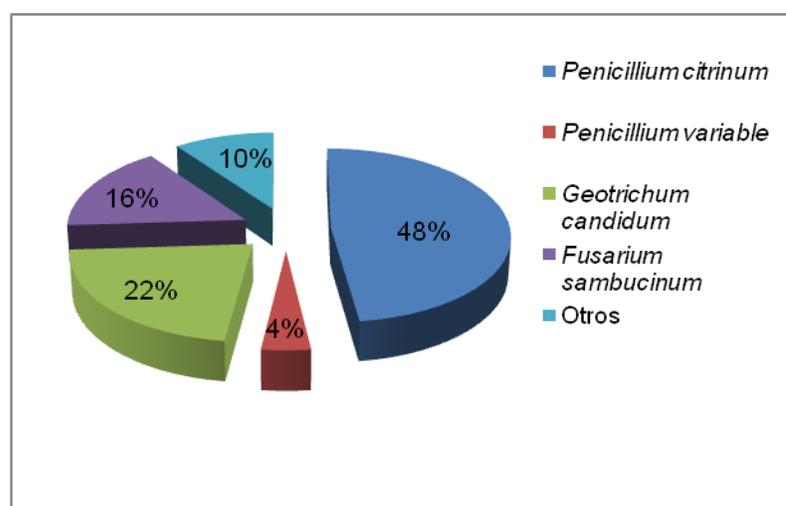
El agar Extracto de malta es un medio ácido, rico en glúcidos, que es capaz de aportar todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de mohos y levaduras. Por el carácter ácido del medio, se inhibe el crecimiento de la mayor parte de las bacterias contaminantes (Cultimed, 2003). En relación al agar Czapek, es un medio sintético que contiene sacarosa y nitrato como únicas fuentes de carbono y nitrógeno. Permite el crecimiento adecuado de mohos y levaduras (Sagardoy y Mandolesi, 2004).

Inmediatamente después del crecimiento de las colonias, se procedió a la identificación por examen macroscópico de las características externas y por la observación directa al microscopio, por medio del método de la cinta adhesiva. Se realizó colocando la parte adhesiva de la cinta en la superficie de la colonia y se pegó sobre un portaobjetos que contenía una gota de azul de algodón (Silva, 2006). La técnica de coloración de microorganismos para observarlos al microscopio es una técnica que comenzó a utilizarse hace más de 100 años (Toro, 2005).

Al respecto se tiene que para la muestra correspondiente a Oderí I, se pudieron aislar e identificar principalmente mohos de la especie *Penicillium citrinum* (48%), *Penicillium variable* (4%), *Geotrichum candidum* (22%), *Fusarium sambucinum* (16%) y otros no encontrados en la clave taxonómica empleada (10%), lo cual podría indicar que carecen de importancia en el área de los alimentos. Esto se puede observar en la tabla 6 y figura 20.

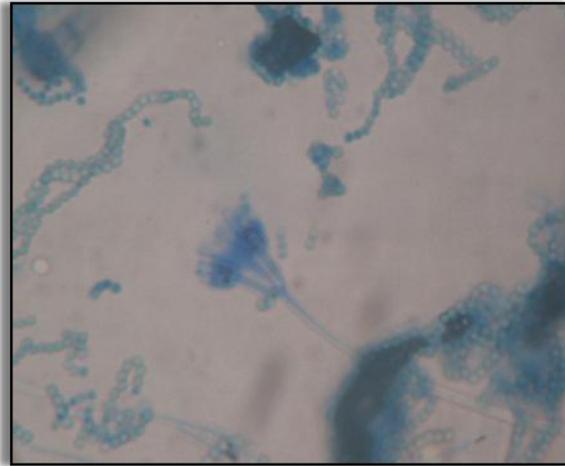
**Tabla 6. Principales especies de mohos aislados de la muestra Oderí I**

Mohos	nº Cepas	Porcentaje (%)
<i>Penicillium citrinum</i>	24	48
<i>Penicillium variable</i>	2	4
<i>Geotrichum candidum</i>	11	22
<i>Fusarium sambucinum</i>	8	16
Otros	5	10



**Fig. 20. Principales especies de mohos aislados de la muestra Oderí I**

*Penicillium citrinum*, es un moho que alcanza un diámetro de 1-1,5 cm en 7 días, consiste en una densa masa de conidióforos azul verdoso (figura 21). Es común en los cereales y especias tropicales, con una distribución en todo el mundo. Producen metabolitos tóxicos como las citrininas (Samson, 1995).



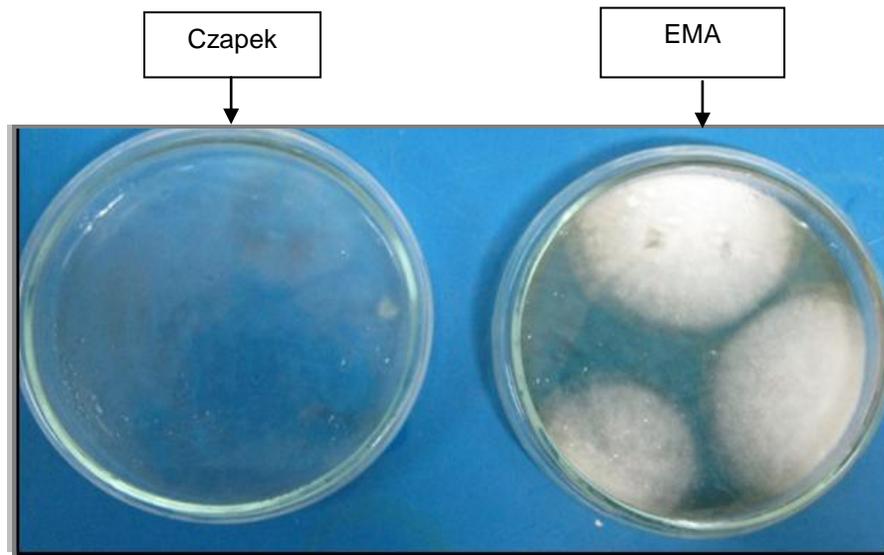
**Fig. 21. *Penicillium citrinum* visto al microscopio**

Las citrininas son producidas por muchos *Penicillium* spp. y varias especies de *Aspergillus* spp. (Blanc y col., 1995; Xu y col., 1999). Aunque es una micotoxina importante, en particular, del riñón, no hay normas internacionales específicamente para ello en los alimentos (Magan y Olsen, 2004). La nefrotoxicidad se observó en ratones, ratas, conejos, aves de corral, perros, cerdos, entre otros (Frank, 1992). Las citrininas también son embriotóxicos, teratogénicos y genotóxicos en pruebas a corto plazo. Se observaron adenomas renales benignos en ratas alimentadas con citrininas durante 40 semanas (Nishijima, 1984).

Con respecto a *Penicillium variable*, alcanza un diámetro de 1-1,5 cm en 7 días, consiste en un micelio amarillo con conidióforos en la parte central. Su coloración va desde amarillo a naranja-marrón. Puede ser aislado de frutas, cereales, arroz, maíz, jugos de frutas, cacahuets. Posee capacidad toxigénica por la elaboración de una micotoxina llamada rugulosina, sin

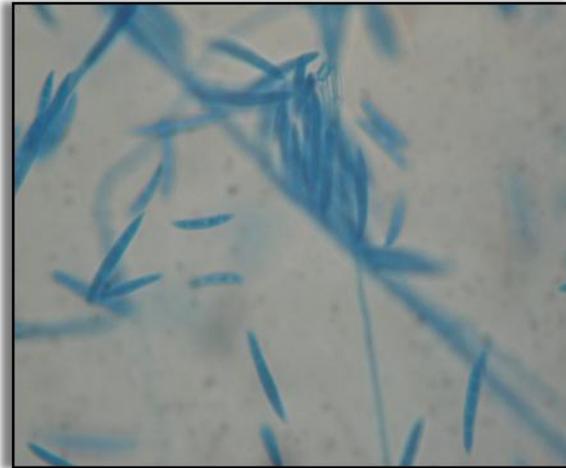
embargo, su efecto en animales y humanos no ha sido detectado (Samson, 1995).

*Geotrichum candidum*, alcanza un diámetro de 7 cm en 7 días, de color blanco, con olor dulce frecuentemente (figura 22). Formado por hifas septadas, ramificadas dicotómicamente. Su distribución es mundial: suelo, agua, aire, maíz, arroz, granos, entre otros (Samson, 1995).



**Fig. 22. Colonias de *Geotrichum candidum* aisladas en placas de Czapek y EMA**

*Fusarium sambucinum*, alcanza un diámetro de 3,4 - 5,9 cm en 4 días. De color blanco a gris (figura 23). Habita en los cereales, las papas, las hierbas, cortezas de árboles, también en los suelos. Tiene características toxigénicas por producción de metabolitos como los tricotecenos, entre otros (Samson, 1995).



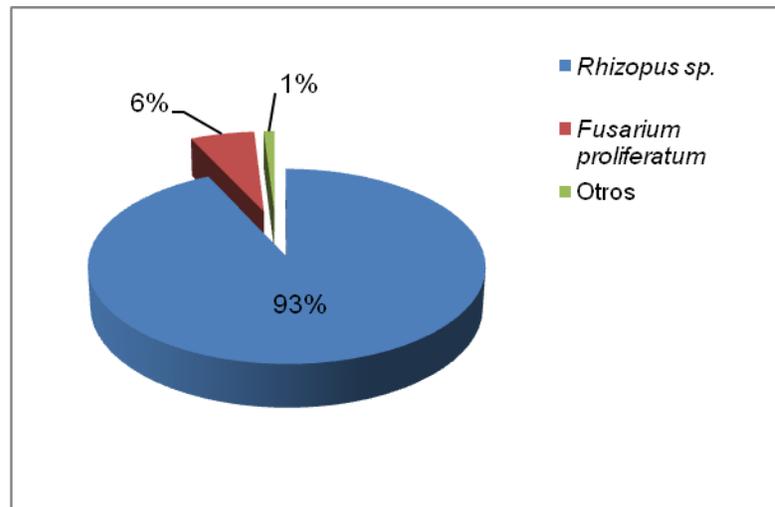
**Fig. 23. Macroconidias de la especie *Fusarium sambucinum* vistas al microscopio**

La ingestión aguda y crónica de los tricotecenos por los seres humanos y los animales pueden provocar una variedad de efectos tóxicos, incluyendo fiebre, diarrea, vómitos, necrosis, hemorragias, inhibición de la síntesis de proteínas, y el agotamiento de la médula ósea (DeVries y col., 2000).

Siguiendo esta orientación, la muestra Oderí II permitió el aislamiento e identificación de mohos de las especies *Rhizopus sp.* (93%), *Fusarium proliferatum* (6%) y otros no encontrados en la clave taxonómica empleada (1%), lo que puede indicar que no tienen importancia en el área de los alimentos. Esto se puede observar en la tabla 7 y figura 24.

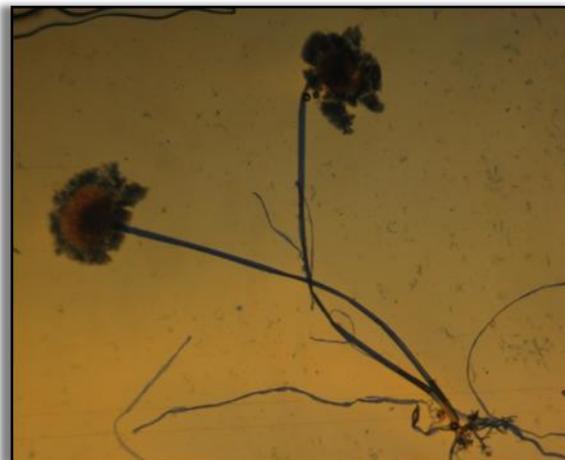
**Tabla 7. Principales especies de mohos aislados de la muestra Oderí II**

<b>Mohos</b>	<b>nº Cepas</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<i>Rhizopus sp.</i>	496	93
<i>Fusarium proliferatum</i>	30	6
Otros	7	1



**Fig. 24. Principales especies de mohos aislados de la muestra Oderí II**

*Rhizopus sp.* es un moho que tiene esporangióforos no ramificados con rizoides que aparecen en el punto donde se origina el estolón, en la base del esporangióforo (Forbes, 2007). Están distribuidos en todo el mundo, con una coloración marrón-gris (figura 25) (Samson, 1995). Se pueden producir infecciones pulmonares en personas expuestas a las esporas de estos mohos, lo cual puede llegar a ser muy peligroso (Tortora, 2007).



**Fig. 25. *Rhizopus sp.* visto al microscopio**

En lo que respecta a la especie *Fusarium proliferatum*, alcanza un diámetro de 3,5-5,5 cm en 4 días. Tiene micelio aéreo, violeta, rosado pálido o grisáceo. Al principio conidióforos no ramificados, después ramificado con mono y polifialides (figura 26). Aislado específicamente de las orquídeas, los higos, arroz, maíz y otros cereales. Es conocido por su producción de metabolitos tóxicos como: fumonisinas, fusarina C, moniliformina, entre otros (Samson, 1995).



**Fig. 26. *Fusarium proliferatum* visto al microscopio**

Se ha comprobado la aparición de edemas pulmonares en cerdos por inyección intravenosa de la micotoxina fumonisina (Harrison y col., 1990; Colvin y Harrison, 1992; Gumprecht y col., 1998; Haschek y col., 2001), así como muertes prenatales en hámsteres (Floss y col., 1994; Shephard y col., 1996). De la misma manera, en pollos de engorde se ha reportado índices de mortalidad y lesiones en varios órganos como el hígado, riñón, corazón y pulmón (Javed y col., 1992). Por otra parte, aunque es seguro que las fumonisinas causan varios daños en los animales, el impacto en la salud humana no es claro. El consumo de alimentos que contienen fumonisinas se

ha vinculado epidemiológicamente a la alta incidencia de cáncer y otras condiciones de salud en algunas zonas del mundo (Sydenham y col., 1991; Rheeder y col., 1992).

Fusarina C es una micotoxina que podría estar implicada en el cáncer humano de esófago en Sudáfrica y China. Hay evidencia de carcinogenicidad de la fusarina C (Li y col., 1990).

Ahora bien, moniliformina es un metabolito cuyo interés principal es su cardiotoxicidad, un efecto que se ha demostrado en aves de corral (Zhang y Li, 1989, Nagaraj y col., 1996). Mientras que Zhang y Li (1989), consideran que la moniliformina podría ser un agente causal de una enfermedad endémica del corazón que se producen en los seres humanos en China. Ha habido otros informes que demuestran que la ocurrencia natural de la moniliformina está muy extendida en otras partes del mundo (Sharman y col., 1991).

Conviene señalar que a partir de la muestra del INIA, se logró aislar e identificar mohos de la especie *Aspergillus penicillioides* (14%), *Penicillium expansum* (63%) y *Rhizopus sp.* (23%). Tabla 8 y figura 27.

**Tabla 8. Principales especies de mohos aislados de la muestra del INIA**

<b>Mohos</b>	<b>nº Cepas</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<i>Aspergillus penicillioides</i>	3	14
<i>Penicillium expansum</i>	14	63
<i>Rhizopus sp.</i>	5	23

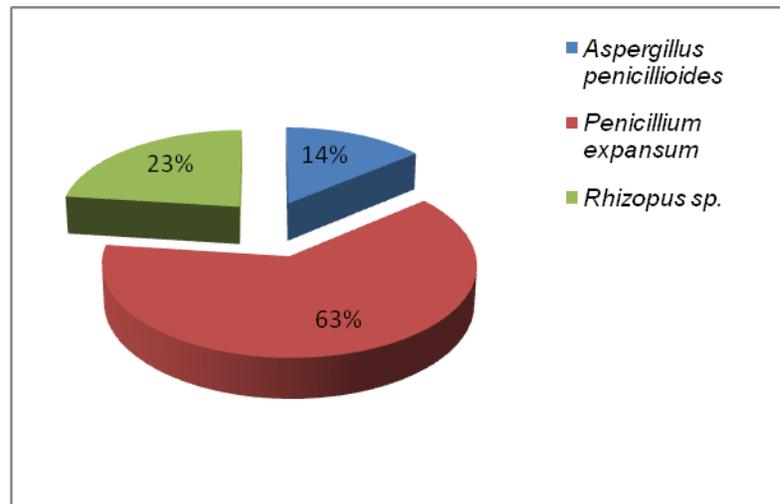


Fig. 27. Principales especies de mohos aislados de la muestra del INIA

Las características de *Rhizopus sp.* fueron detalladas previamente. En relación a la especie *Aspergillus penicillioides*, estos esporulan después de 14 días. Constan de una densa masa de conidióforos verdes oscuros y de paredes lisas (figura 28). Esta especie es común en los productos con una actividad de agua baja, como las especias, frutos secos, nueces, productos de panadería, entre otros. No son micotoxigénicos (Samson, 1995).

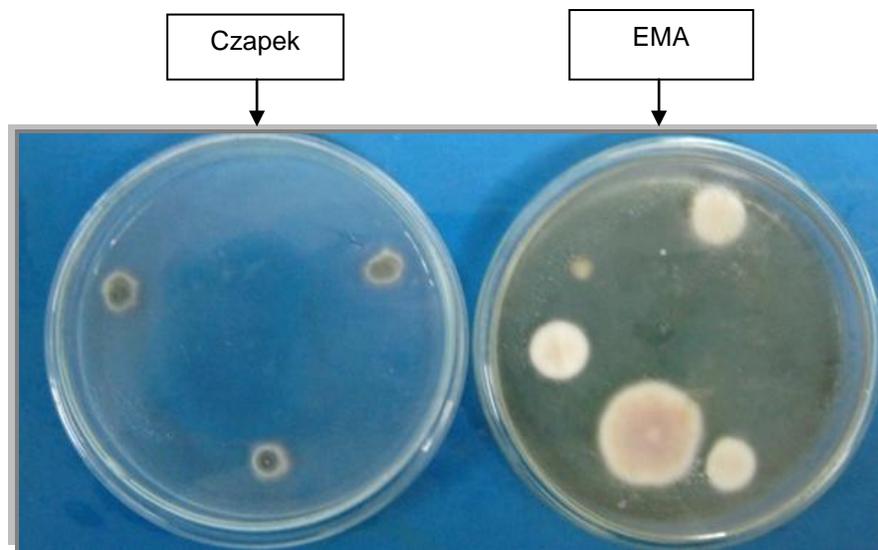


Fig. 28. Colonias de *Aspergillus penicillioides* aisladas en placas de Czapek y EMA

*Penicillium expansum* alcanza un diámetro de 4-5 cm en 14 días, es de amarillo a azul-verdoso. Con un olor pronunciado a frutas. Tiene fiáldes cilíndricas como también conidias subglobosas a elipsoidales (figura 29). Es común en las nueces y frutas. Posee capacidad toxigénica por producción de roquefortina C, citrinina, patulina, entre otras (Samson, 1995).



**Fig. 29. *Penicillium expansum* visto al microscopio**

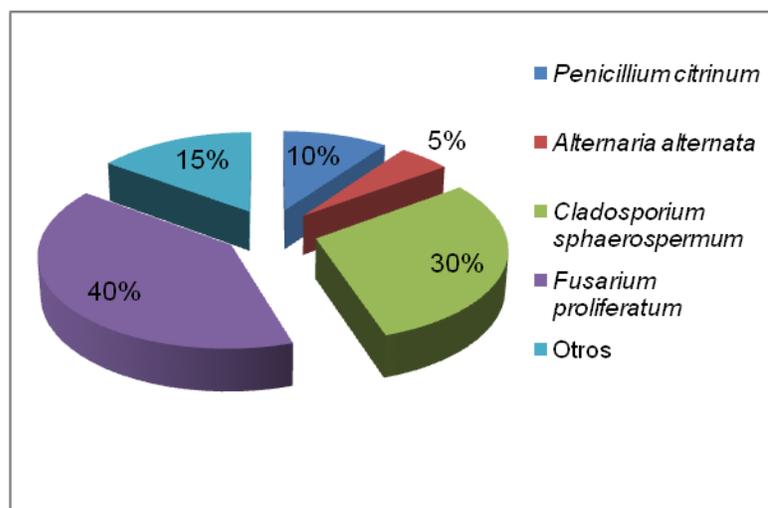
Los efectos de las citrininas fueron explicados en detalle anteriormente. Hay algunas pruebas de las propiedades neurotóxicas de roquefortina C. Sin embargo, en ciertos experimentos realizados no se reportó toxicidad en ratones y ovejas (Scott, 1984; Bauer y col., 1997).

Por otra parte, los signos tóxicos de patulina hallados en ratones, ratas y hámsters fueron convulsiones, disnea, congestión pulmonar, úlceras, dilatación del tracto gastrointestinal, entre otros (Magan y Olsen, 2004). Otros estudios con ratas mostraron altas tasas de mortalidad, debido a la dilatación aguda del intestino y/o neumonía (Speijers y Franken, 1989; Wouters y Speijers, 1996).

En lo que respecta a la muestra perteneciente a El Rosario, se consiguió aislar e identificar mohos de la especie *Penicillium citrinum* (10%), *Alternaria alternata* (5%), *Cladosporium sphaerospermum* (30%), *Fusarium proliferatum* (40%) y otros no encontrados en la clave taxonómica empleada (15%), lo que puede indicar que carecen de importancia en el área de los alimentos. Ver tabla 9 y figura 30.

**Tabla 9. Principales especies de mohos aislados de la muestra El Rosario**

Mohos	nº Cepas	Porcentaje (%)
<i>Penicillium citrinum</i>	2	10
<i>Alternaria alternata</i>	1	5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	6	30
<i>Fusarium proliferatum</i>	8	40
Otros	3	15



**Fig. 30. Principales especies de mohos aislados de la muestra El Rosario**

Las propiedades de la especie *Penicillium citrinum* y *Fusarium proliferatum* fueron explicadas anteriormente. Es de acotar que *Alternaria*

*alternata* se caracteriza por ser de color negro, negro-oliváceo o gris. Los conidióforos tienen de 1-3 septos, simples o ramificados, ocasionalmente lineal o ondulantes o, a veces doblados, con uno o varios poros apicales. Destacan los conidios en largas cadenas, a menudo ramificados, ovoides o elipsoidales; con un pico corto de forma cónica o cilíndrica (figura 31) (Samson, 1995).

Su distribución es mundial, pero es común en muchas clases de plantas, alimentos, suelos, entre otros. Entre las micotoxinas que genera destacan alternariol, alternariol monometil-éter, ácido tenuazonico y altertoxinas (Samson, 1995).



**Fig. 31. *Alternaria alternata* visto al microscopio**

Con respecto a alternariol y alternariol monometil-éter, se tiene que no son muy tóxicos pero tienen capacidad mutagénica (Schrader y col., 2001). No obstante, hay alguna evidencia de propiedades carcinogénica de estas micotoxinas en animales. Los efectos se han observado en la mucosa del

esófago de ratones alimentados con 50-100 mg/kg de peso corporal por día de alternariol monometil-éter durante 10 meses (Yekeler y col., 2001).

El ácido tenuazonico no es mutagénico en sistemas bacterianos. Sin embargo, es tóxico para varias especies animales. En los perros causó hemorragias en varios órganos, con dosis diarias de 10 mg/kg de peso corporal y en los pollos se observó toxicidad sub-aguda con 10 mg/kg en el alimento. También se encontraron cambios en la mucosa esofágica de ratones alimentados con 25 mg/kg de peso corporal por día de ácido tenuazonico durante 10 meses (Yekeler y col., 2001).

Las altertoxinas son toxinas y mutágenos más potentes que alternariol y alternariol monometil-éter en los ratones (Chelkowski y Visconti, 1992; Schrader y col., 2001). Las altertoxinas han sido probadas positivamente en bioensayos de células que detectan promotores tumorales (Osborne y col., 1988).

A todo ello se agrega la especie *Cladosporium sphaerospermum*, que alcanza un diámetro de 1,5 -2 cm en 10 días, con estructura aterciopelada de color verde oliva a pardo oliváceo. Los conidióforos son laterales y terminales, de hasta 300  $\mu\text{m}$  de largo, pero por lo general mucho más cortos y anchos de 3-5  $\mu\text{m}$ , con varias cadenas ramificadas (figura 32). Es una especie distribuida en todo el mundo y que se produce como un invasor secundario en muchas plantas. Aislado de aire, suelo, productos alimenticios, semillas, pintura, entre otras (Samson, 1995).

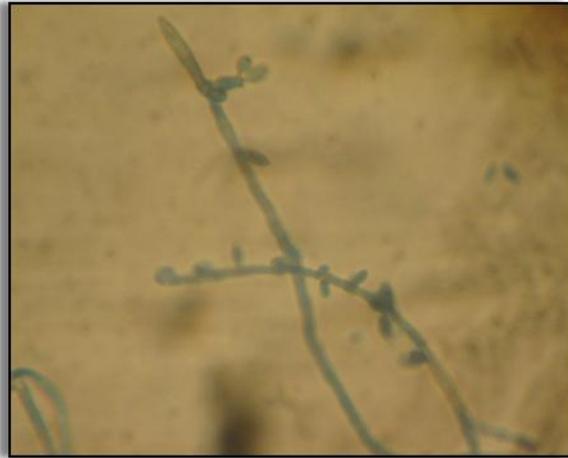
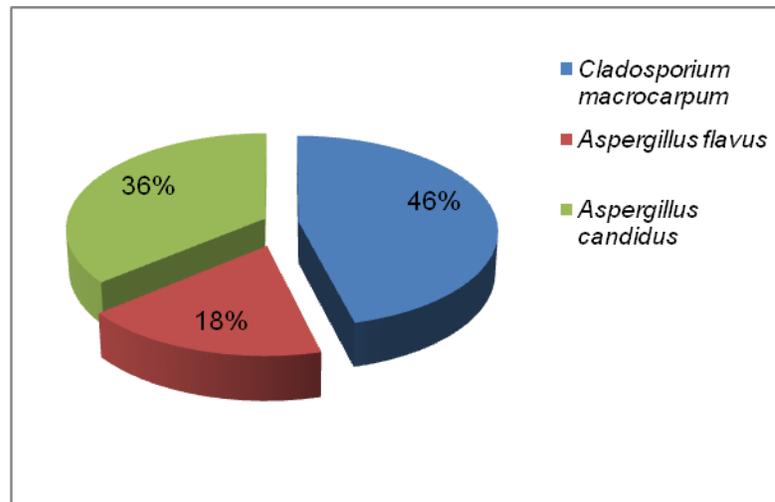


Fig. 32. *Cladosporium sphaerospermum* visto al microscopio

Dentro de este orden de ideas, de la muestra perteneciente a El Verde se pudo aislar e identificar mohos de las especies *Cladosporium macrocarpum* (46%), *Aspergillus flavus* (18%) y *Aspergillus candidus* (36%). Esto se puede observar en la tabla 10 y figura 33.

Tabla 10. Principales especies de mohos aislados de la muestra El Verde

Mohos	nº Cepas	Porcentaje (%)
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	10	46
<i>Aspergillus flavus</i>	4	18
<i>Aspergillus candidus</i>	8	36



**Fig. 33. Principales especies de mohos aislados de la muestra El Verde**

Es significativo destacar que *Cladosporium macrocarpum*, es un moho que alcanza un diámetro de 2,5-3,5 cm en 10 días, con textura aterciopelada. El micelio es de color verde oliva, los conidióforos surgen lateralmente a partir de las hifas, con un tamaño de hasta 300  $\mu\text{m}$  de largo y 4.8  $\mu\text{m}$  de ancho. Los Conidios son en su mayoría de una sola célula y elipsoidales (figura 34). Su distribución es mundial, pudiendo ser aislado del suelo, de semillas de los cereales, de plumas de aves de vida libre (Samson, 1995).



**Fig. 34. *Cladosporium macrocarpum* visto al microscopio**

Según Samson (1995), *Aspergillus flavus* llega a obtener un diámetro de 3-5 cm en 7 días, de color amarillo-verde oscuro. Los conidios son radiales, desde globosos a subglobosos. Los conidióforos son cilíndricos con un tamaño de hasta 1 mm de longitud. Las vesículas pueden ser desde globosas a subglobosas. Las fiálides son soportadas directamente por la vesícula o por las métulas (figura 35). Son comunes en los frutos secos, especias, semillas de oleaginosas, cereales. Es productor de metabolitos tóxicos importantes como: ácido 3-nitropropiónico, ácido ciclopiazónico, aflatoxina B<sub>1</sub>, entre otros.



**Fig. 35. *Aspergillus flavus* visto al microscopio**

El ácido 3-nitropropiónico no es cancerígeno y/o mutágeno, la característica principal es que tóxico produciendo cambios patológicos en el cerebro. Durante 1972-1989 hubo 217 brotes de intoxicación con el ácido 3-nitropropiónico en China, por el consumo de caña de azúcar que había sido almacenado inadecuadamente, reportándose 88 muertes (Ludolph y col., 1991; Liu y col., 1992). Las víctimas eran en su mayoría niños y jóvenes y los

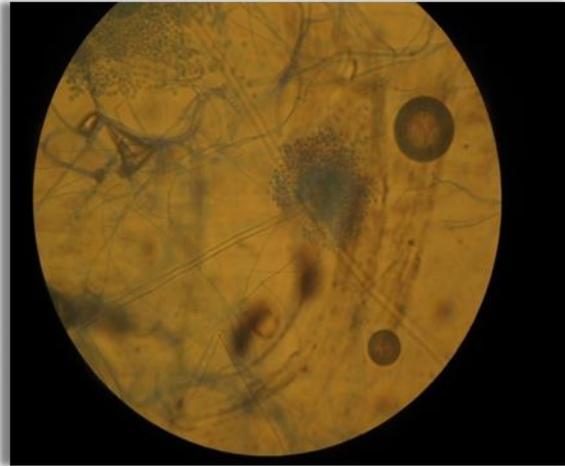
síntomas clínicos principales incluyeron vómitos, distonía y coma. La mayor concentración de ácido 3-nitropropiónico en una muestra mohosa de caña de azúcar, que causó una intoxicación humana, era 6600 mg/kg (Liu y col., 1992).

Por su parte, el ácido ciclopiazónico es tóxico para las ratas, cerdos, cuyes, perros y aves de corral, afectando a varios órganos (Voss y col., 1990; Smith y col., 1992). Aunque no se conocen sus propiedades carcinógenas en animales, se sabe que es mutagénico (Sorenson y col., 1984). Se detectó en las semillas de mijo en la India, con la intoxicación de varios seres humanos (Rao y Husain, 1985).

Conviene señalar que la aflatoxina B<sub>1</sub> es un agente cancerígeno genotóxico que contribuye al riesgo de padecer cáncer hepático, incluso a dosis sumamente bajas. Existen suficientes evidencias acerca de su carácter carcinogénico para el hombre, tanto aisladamente como en mezclas naturales con otras aflatoxinas. Además, esta toxina puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa nucleótido cíclica en el cerebro, hígado, corazón y tejidos renales (Soriano, 2007).

Por último, se tiene a *Aspergillus candidus* que consigue un diámetro de 1-1,5 cm en 7 días. Las cabezas de los conidios son blancas, después de color crema. Las vesículas son globosas a subglobosas, con un tamaño de 10-50 µm de diámetro. Las fiálides están adheridas directamente en la vesícula, pero sobretodo en las métulas (figura 36). Esta especie se

encuentra en cereales. Producen metabolitos tóxicos como xantoascina, entre otros (Samson, 1995).



**Fig. 36. *Aspergillus candidus* visto al microscopio**

Las xantoascinas son metabolitos hepatotóxicos, cardiotóxicos y teratogénicos en animales de experimentación (Ohtsubo y col., 1976; Takahashi y col., 1976).

Para de la muestra originaria de El Vigía, se aisló e identificó únicamente mohos de la especie *Penicillium citrinum*, ya explicada en detalle anteriormente, de manera que corresponde al 100% (Tabla 11).

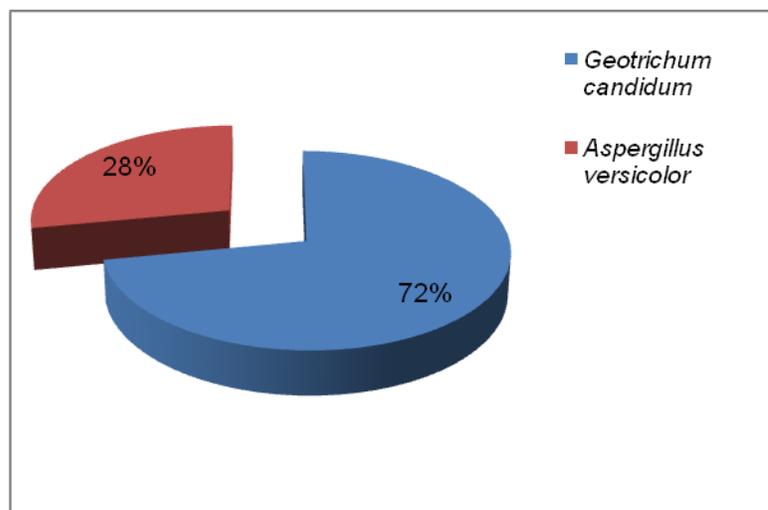
**Tabla 11. Principales especies de mohos aislados de la muestra El Vigía**

<b>Mohos</b>	<b>nº Cepas</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<i>Penicillium citrinum</i>	566	100

Para de la muestra designada como Curiepe, se halló mohos de las especies *Geotrichum candidum* (72%) y *Aspergillus versicolor* (28%). Ver tabla 12 y figura 37.

**Tabla 12. Principales especies de mohos aislados de la muestra Curiepe**

Mohos	nº Cepas	Porcentaje (%)
<i>Geotrichum candidum</i>	150	72
<i>Aspergillus versicolor</i>	58	28



**Fig. 37. Principales especies de mohos aislados de la muestra Curiepe**

*Geotrichum candidum* fue detallada en un párrafo anterior. En cuanto a *Aspergillus versicolor*, este logra un diámetro de 1-1,5 cm en 7 días. Es de color blanco al principio, luego cambia a amarillo. Los conidióforos son cilíndricos y de paredes lisas. Las vesículas son desde subglobosas a elipsoidales, de 12-16  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las fiálides nacen en las métulas. Es común en queso, cereales, suelo, frutos secos, entre otros (figura 38). Produce metabolitos tóxicos como esterigmatocistina (Samson, 1995).

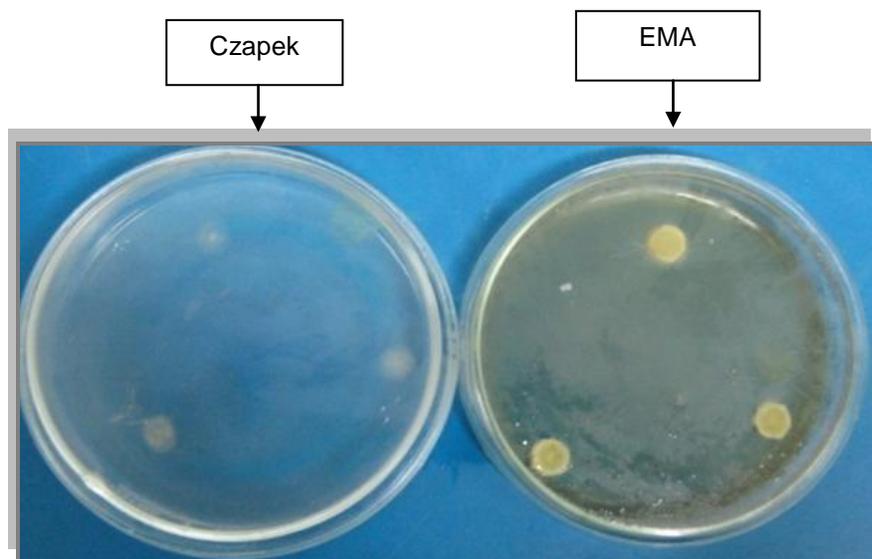


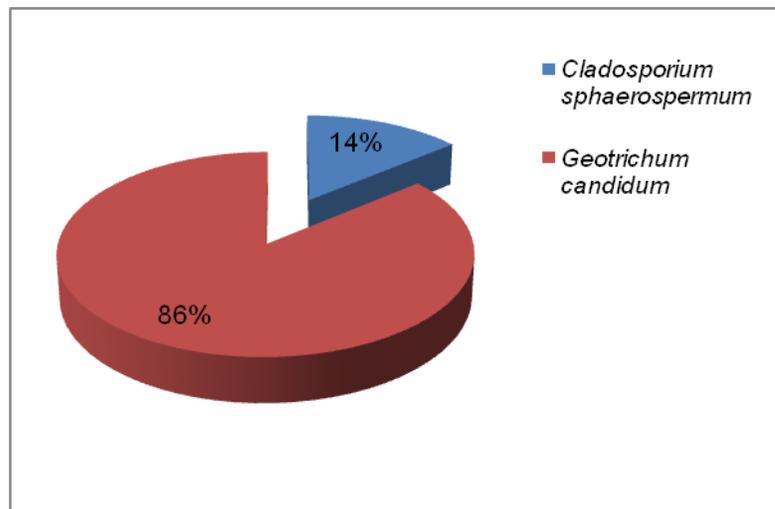
Fig. 38. Colonias de *Aspergillus versicolor* aisladas en placas de Czapek y EMA

En lo que respecta a esterigmatocistina, se tiene que su mutagenicidad, citotoxicidad y carcinogenicidad han sido revisados por Terao (1983). Es mucho menos hepatocarcinogénica que la aflatoxina B<sub>1</sub> (Terao, 1983; Gopalakrishnan y col, 1992; Scudamore y col., 1996).

Finalizando este aspecto, a partir de la muestra La Trinidad, se logró aislar e identificar los siguientes mohos: *Cladosporium sphaerospermum* (14%), y *Geotrichum candidum* (86%), los cuales fueron detallados previamente. Ver tabla 13 y figura 39.

Tabla 13. Principales especies de mohos aislados de la muestra La Trinidad

Mohos	nº Cepas	Porcentaje (%)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	32	14
<i>Geotrichum candidum</i>	203	86



**Fig. 39. Principales especies de mohos aislados de la muestra La Trinidad**

Sánchez y col., 2008 reportaron que las especies de mohos predominantes en el cacao son aquellas pertenecientes a los géneros: *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus*, los cuales fueron halladas en la presente investigación, con excepción de *Mucor*.

Cabe aseverar que Maridueña y col. (2010), efectuaron un estudio en granos de cacao, con el fin de identificar los principales patógenos causantes de enfermedades fungosas, en el cual se seleccionaron muestras con síntomas diversos y luego de proceder a su descripción y aislamiento, se identificó la presencia de diferentes especies de los géneros: *Moniliophthora*, *Verticillium*, y *Fusarium*. Este último fue encontrado en las muestras de Oderí I, Oderí II y El Rosario.

Angell (2003), manifestó que los mohos corrientes en cacao son: *Aspergillus glaucus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. tamarii* y especies de *Penicillium* y de *Mucor*. De los anteriores microorganismos mencionados, sólo se hallaron

en las muestras analizadas *Aspergillus flavus* (en El Verde) y diferentes especies del género *Penicillium* (en Oderí I, INIA, El Rosario y El Vigía). A juicio de este investigador, los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Paecilomyces*, son considerados problemas para los comercializadores y consumidores.

León (2012), llevo a cabo una investigación similar en la que determinó la presencia de los siguientes mohos en granos de cacao fermentados y secados: *Cladosporium sphaerospermum*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus penicillioides*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus fumigatus* y *Absidia corymbifera*. Estos resultados se relacionan con los reportados en este estudio, salvo las dos últimas especies nombradas que no se hallaron en ninguna de las muestras analizadas.

Las muestras correspondientes a Oderí I y El Rosario, fueron las que mostraron mayor diversidad de mohos; además *Penicillium citrinum* estuvo presente en ambos casos, siendo más predominante en la primera muestra con un 48% mientras que en la segunda en un 10%. Es importante recordar que los granos de cacao de Oderí I, fueron almacenados en un galpón donde las condiciones ambientales no eran favorables para la estadía de estos productos, y posiblemente esto haya contribuido a la variedad de los microorganismos contaminantes. Es de hacer notar que esta misma especie se encontró en un 100 % en la muestra de El Vigía.

Si se observa, la muestra de Oderí II tuvo un alto porcentaje para la especie *Rhizopus sp.* con un 93%, representado a 496 cepas o colonias. También fue aislada en la muestra del INIA pero con un 23% que atañe a sólo 5 cepas. En esta misma dirección León (2012), también identificó mohos pertenecientes a la especie *Rhizopus sp* en tres muestras de cacao obtenidas de diferentes proveedores.

El crecimiento de mohos, depende del grado de humedad y de la temperatura de los granos. El bajo pH derivado de la producción de ácido láctico favorece su crecimiento ya que son ácido-resistentes. Su presencia es importante, puesto que si fuesen capaces de llegar al núcleo del grano podrían estropear la manteca. Algunos mohos son capaces de liberar lipasas, un problema para los productos terminados como el chocolate, pues dejarían ácidos grasos libres, que harían bajar el punto de fusión de la manteca y producen sabores desagradables (Agell, 2003).

En atención a lo establecido en la cita anterior, es preciso evitar el desarrollo de los mohos, particularmente mediante un control de la humedad por debajo del 8%, pero como ya se mencionó este factor no influyó en la proliferación. Por otra parte, tal como se mencionó en el marco teórico, García (2005), expone que el pH óptimo de crecimiento de los mohos es 5,6, de manera que para las muestras del INIA y El Rosario se presume que este factor contribuyó notablemente para la invasión fúngica, ya que los valores de pH encontrados en estos casos fueron de 5,67 y 5,54, respectivamente. Ahora bien, se deben acatar buenas prácticas de almacenamiento, ya que es

en esta etapa donde se determina la flora contaminante de los granos; lo cual se refleja en las características sensoriales de los productos finales. Por esta razón, se piensa que la amplitud y la variabilidad de mohos identificados en las muestras, están relacionadas con los diferentes almacenamientos aplicados.

Recordando lo expresado en la revisión bibliográfica por Hussein (2001), la mayoría de las micotoxinas son producidas por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Claviceps*. Ahora, se puede señalar teóricamente que de las especies identificadas en esta investigación, casi todas tienen capacidad de producir metabolitos tóxicos, con excepción de *Geotrichum candidum*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus penicillioides*, *Cladosporium sphaerospermum* y *Cladosporium macrocarpum*, que no son considerados micotoxigénicos. Es por esta razón que es importante controlar la proliferación de estos microorganismos potencialmente peligrosos para la salud pública y tomar medidas asépticas al momento de manipular dichas muestras, en especial las designadas como Oderí I y II, INIA, El Rosario, El Verde, El Vigía y Curiepe, ya que la perteneciente a La Trinidad no mostró mohos productores de micotoxinas.

## **2.4 GRADO DE INFESTACIÓN EN MUESTRAS DE CACAO NO FERMENTADAS Y SECADAS**

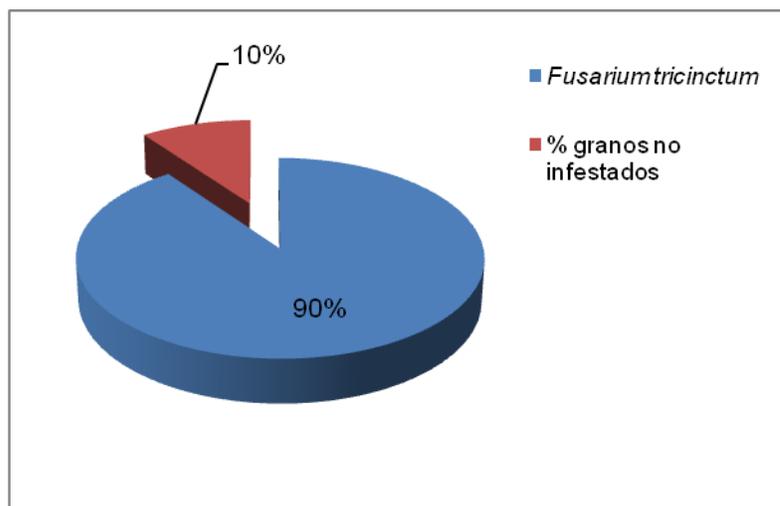
Es un procedimiento en el cual se emplea un desinfectante (hipoclorito de sodio 0,4% y alcohol 80%) para inactivar la flora superficial de la muestra

analizada, por lo que se presume que el crecimiento es originado por la flora fúngica interna (Raybaudi y col., 2010). Por su parte, también se emplean placas de agar DRBC (Diclorán rosa bengala clorafenicol). Los resultados para muestras de cacao sin fermentar y secadas se registran en la tabla 14.

**Tabla 14. Grado de colonización de granos de cacao sin fermentar y secados, de dos variedades, almacenados bajo las mismas condiciones**

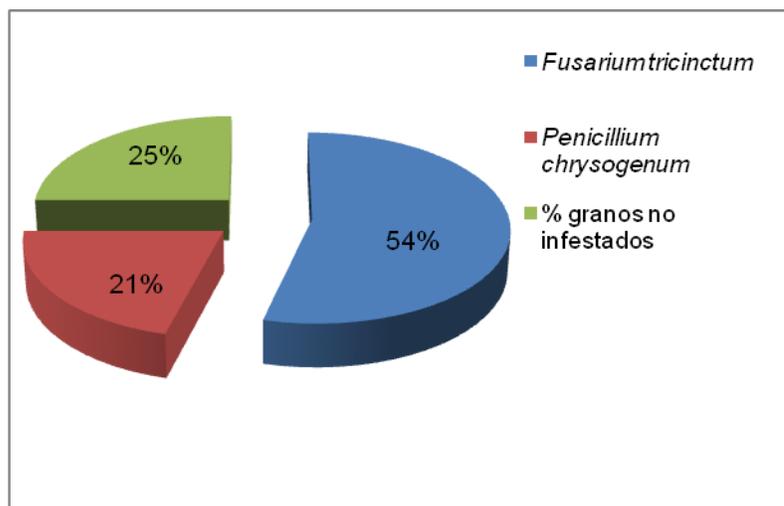
Muestras	N° total de granos empleados	N° de granos infestados	Porcentaje de infestación (%)
Oderí I	52	47	90
Oderí II	52	39	75

La muestra Oderí I alcanzó un porcentaje de colonización de 90%, los cuales correspondían en su totalidad con la especie *Fusarium tricinatum*, esto puede apreciarse en la figura 40.



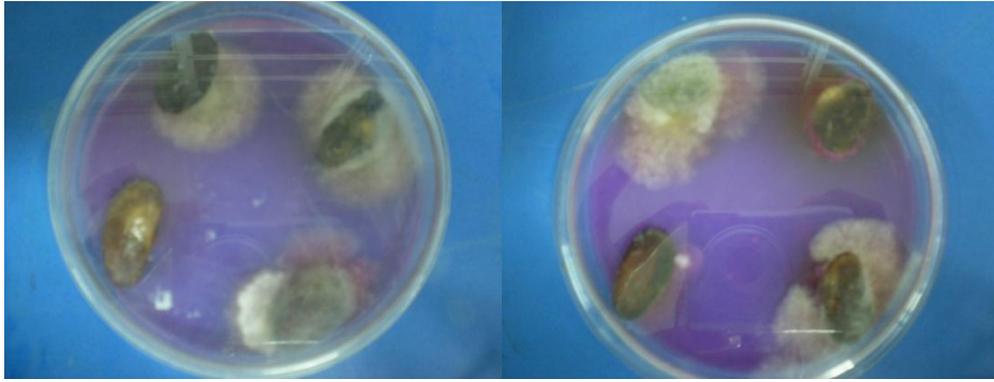
**Fig. 40. Grado de infestación en la muestra Oderí I**

Mientras tanto la muestra Oderí II llegó a un 75% de infestación, distribuidos con un 54% para la especie *Fusarium tricinctum* y 21% para la especie *Penicillium chrysogenum*. Lo dicho anteriormente también es visible en la figura 41.



**Fig. 41. Grado de infestación en la muestra Oderí II**

*Fusarium tricinctum* es un moho distribuido en todo el mundo, pero es más común en zonas templadas. Se ha demostrado que esta variedad tiene capacidad micotoxigénica. El desarrollo de la colonia en semilla es rápido y el micelio aéreo blanco es entre ligero y denso, con masas de esporas anaranjadas que aparecen a medida que envejece el cultivo (figura 42). Las características más distintivas de este patógeno son los abundantes microconidios en forma de limón o pera (Warham, 1971).



**Fig. 42. Granos de cacao de la muestra Oderí II infestados por *Fusarium tricinatum***

Por su parte, *Penicillium chrysogenum* es un moho cuyo componente activo es la penicilina (Tortora, 2007). Sus colonias crecen rápidamente, alcanzando un diámetro de 4 a 5 cm en 10 días, de color amarillo-verde pálido o verde-azul. Producen típicamente un exudado en forma de gotas amarillas.

Es muy común en diversos productos alimenticios, también en productos con baja actividad de agua. Produce la micotoxina Roquefortina C (los efectos de la misma fueron mencionados previamente), entre otras. (Samson, 1995).

Por consiguiente, es oportuno emplear medidas para el control de los mohos en estos cacaos no fermentados, ya que las especies identificadas en ambas muestras tienen propiedades tóxicas, lo cual representa un riesgo para la salud pública.

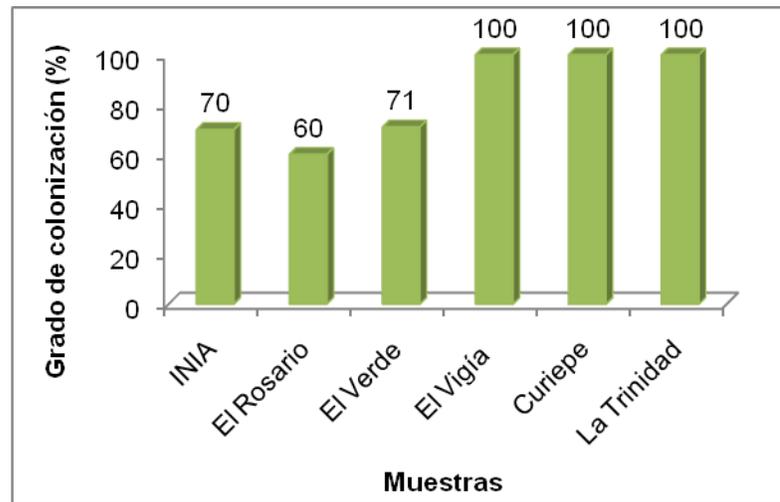
## 2.5 GRADO DE INFESTACIÓN EN MUESTRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECADAS O NO

Los resultados para muestras de cacao fermentadas y secadas se registran en la tabla 15.

**Tabla 15. Grado de colonización de granos de cacao fermentados y secados en diferentes zonas del Estado Miranda**

<b>Muestras</b>	<b>N° total de granos empleados</b>	<b>N° de granos infestados</b>	<b>Porcentaje de infestación (%)</b>
<b>INIA</b>	52	36	70
<b>El Rosario</b>	52	31	60
<b>El Verde</b>	52	37	71
<b>El Vigía</b>	52	52	100
<b>Curiepe</b>	52	52	100
<b>La Trinidad</b>	52	52	100

La muestra del INIA manifestó un porcentaje de colonización de 70%, por su parte la muestra de El Rosario llegó sólo a 60% y la muestra de El Verde un 71%. El resto obtuvo una infestación de granos máxima (100%), es decir, para las muestras de El Vigía, Curiepe y La Trinidad. Esto también se observa en la figura 43.



**Fig. 43. Grado de infestación en granos de cacao fermentados y secados**

La muestra de El Rosario fue la que presentó el porcentaje de infestación más bajo, los cuales correspondían en su totalidad con la especie *Geotrichum candidum*.

Las muestras del INIA y El Verde, obtuvieron porcentajes de infestación muy cercanos entre sí, con la diferencia que en la primera se hallaron mohos de las especies *Penicillium citrinum* (30%) y *Geotrichum candidum* (40%), mientras que en la última predominó sólo la especie *Geotrichum candidum*. Las muestras de El Vigía, Curiepe y La Trinidad fueron igualmente infestadas en un 100% por *Rhizopus sp.* Las propiedades de todas estas especies fúngicas fueron detalladas en párrafos anteriores, así como los efectos de las micotoxinas que producen.

Conociendo las características toxigénicas de los mohos pertenecientes a la especie *Penicillium citrinum*, que se aislaron de los granos del INIA, se debe tener precaución al momento de manipular dicha

muestra, así como evitar la propagación de estas cepas dentro de estos granos.

## VI. CONCLUSIONES

- Las muestras de Curiepe y La Trinidad se corresponden con cacao “fino de primera”, mostrando un índice de fermentación de 81% y 83%, respectivamente.
- La muestra originaria de El Verde alcanzó 5% de almendras pizarrosas, no cumpliendo con las exigencias de la norma COVENIN 50:1995 y corroborando que ciertamente este cacao tuvo un deficiente o ausente proceso fermentativo.
- El porcentaje de semillas atacadas por insectos fue de 4% para la muestra de El Rosario y 5% para la de El Vigía, lo cual se encuentra por encima de lo que estipula la ya mencionada norma.
- La muestra de INIA fue la que presentó el menor porcentaje de granos planos y partidos, con 4%.
- El contenido de humedad de las muestras fermentadas y secadas estuvieron comprendidos entre 5,15- 6,30%, por lo que todas cumplen con las exigencias de la norma COVENIN 50:1995, al tener menos de 8% de humedad.
- La proporción de cenizas se encontraron entre 3,75- 4,50%, proteína cruda entre 14,27-16,49%, grasa cruda entre 40,49-45,50%, fibra cruda entre 12,58-18,06% y otros carbohidratos entre 15,13-17,66%.

- Con respecto al pH osciló entre 5,54-6,43 y para la acidez total se tiene un rango entre 0,81-1,32%. Estos valores son atribuidos a la variabilidad genética de la zona a la cual pertenecen los granos y a la aplicación de metodologías distintas para el beneficio.
- Las muestras de cacao corriente (no fermentadas y secadas) señaladas como Oderí I y Oderí II, presentaron un contaje de mohos de 2,972 Log<sub>10</sub> (UFC/g) y 5,256 Log<sub>10</sub> (UFC/g), respectivamente. Posiblemente los granos tomados para la segunda muestra estaban más contaminados que los escogidos para la primera.
- La muestra de El Vigía presentó la mayor proliferación de mohos en placas con 6,98 log<sub>10</sub> UFC/g, lo cual era de esperarse, ya que el porcentaje de mohos obtenido por medio de la prueba de corte, para este caso fue el más elevado.
- La menor incidencia estadísticamente significativa de mohos, fue para las muestras del INIA con 3,649 log<sub>10</sub> UFC/g y la de El Verde con 4,327 log<sub>10</sub> UFC/g. En el caso de la primera se presume que por mantenerse en refrigeración durante su almacenamiento, las bajas temperaturas controlaron la proliferación de estos microorganismos.
- Las muestras correspondientes a Oderí I y El Rosario, fueron las que mostraron mayor diversidad de mohos durante el aislamiento e

identificación. La muestra de Oderí II tuvo un alto porcentaje para la especie *Rhizopus sp.* con un 93%, representado a 496 cepas o colonias. También fue aislada en la muestra de INIA, pero con un 23% que atañe a sólo 5 cepas.

- Se logró identificar las siguientes especies de mohos: *Penicillium citrinum*, *P. variable*, *P. expansum*, *Fusarium sambucinum*, *F. proliferatum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. versicolor*, las cuales tienen capacidad de producir metabolitos tóxicos. Otras especies identificadas fueron *Geotrichum candidum*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus penicillioides*, *Cladosporium sphaerospermum* y *Cladosporium macrocarpum*, las cuales no son consideradas micotoxigénicas.
- Se deben tomar medidas preventivas al momento de manipular las muestras designadas como Oderí I y II, INIA, El Rosario, El Verde, El Vigía y Curiepe, ya que la perteneciente a La Trinidad no mostró mohos productores de micotoxinas.
- La muestra Oderí I alcanzó un porcentaje de colonización de 90%, mientras que la muestra Oderí II llegó a un 75% de infestación. Las muestras de El Vigía, Curiepe y La Trinidad mostraron una infestación de granos máxima (100%), seguida por la de El Verde (71%), la del INIA (70 %) y la de El Rosario cuyo porcentaje de infestación fue de sólo 60 %.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adomako, D. (1996). *Producción a escala piloto de cenizas de cáscara de cacao*. El Salvador: Cocoa Research Conference.

Agell, O. (2003). La seguridad alimentaria del chocolate. *Observatori de Seguretat Alimentària* , 1-18.

Alvarado, J. (1990). *Variación de las propiedades físicas de la grasa de cacao con la temperatura*. Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.

Alvarez, C. (1998). *Caracterización física, química y físico-química de granos tostados de cacao, cosechados en tres zonas del estado Aragua: Chuao, Cuyagua y Cumboto*. Caracas, Venezuela: Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Alvarez, C. (2008). *Caracterización y tipificación de los parámetros físicos, químicos, físicoquímicos y componentes del sabor y aroma de una población de cacao criollo híbrido de Venezuela*. Caracas, Venezuela: Tesis Doctoral. 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, Edo. Aragua . *Agronomía Tropical* , 1-8.

Alvarez, C., Tovar, L., García, H., Morillo, F., Sánchez, P., Girón, C., y colaboradores. (2010). Evaluación de la calidad comercial del grano de

cacao usando dos tipos de fermentadores. *Revista científica UDO Agrícola*, 10(1):76-87.

Alvarez, Y. (1997). *Efecto del tiempo transcurrido entre la cosecha y el desgrane sobre algunas características del cacao criollo, selección Ocumare 61, durante el proceso de fermentación, utilizando el sistema trinitario*. Maracay, Venezuela: Tesis de Grado. Universidad Central de Venezuela.

Anton, A. (2001). *Hongos y Micotoxinas*. Madrid, España: Fundación Iberica para la Seguridad.

Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (2000). *Official methods of analysis*. Gaithersburg, USA.

Barrera, V., Tapia, C., y Monteros, A. (2004). *Raíces y tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador* . Quito, Ecuador : INIAP .

Batista, L. (2009). *El cultivo de cacao*. Santo Domingo, República Dominicana: Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc (CEDAF).

Bauer, J., Tuller, G., Weidenmann, S., Armbruster, G., Seidel, K., Schams, D., y Hanichen, T. (1997). Toxicity of roquefortine in sheep. *Mykotoxin-Workshop*. 181-5.

Belitz, G., y Grosch, W. (1988). Café, té y cacao. En *Química de los alimentos* (págs. 777-781). Zaragoza, España: Acribia.

Blanc, P., Loret, M., y Goma, G. (1995). Production of citrinin by various species of *Monascus*, *Biotechnol. Lett.*, **17**(3), 291-4.

Braudeau, J. (1975). El cacao. Madrid, España: Blume.

Bylund, M. G. (1994). *Manual de Industrias Lácteas*. Madrid, España: Mundi prensa.

Caravaca, F. (2003). *Bases de la producción animal*. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.

Chelkowski, J., y Visconti, A. (1992). *Alternaria. Biology. Plant Diseases and Metabolites*. Amsterdam: Elsevier.

Christensen, C. (1978). *Fungi and seed quality. Outlook on Agriculture*. New York, USA: Handbook of Applied Mycology. Foods and Feeds.

Colvin, B., y Harrison, L. (1992). Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathología*. **117**, 79-82.

Comisión venezolana de normas industriales. COVENIN. (1995). *Norma venezolana nº 1339. Granos de cacao: Toma de muestras. 1ª revisión*. Caracas, Venezuela: Fondonorma.

Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. (1995). *Norma venezolana nº 442. Granos de cacao: Prueba de corte. 1ª revisión*. Caracas, Venezuela: Fondonorma.

Comisión venezolana de normas industriales. COVENIN. (1995). *Norma venezolana nº 50. Granos de cacao. 2da revisión*. Caracas, Venezuela: Fondonorma.

Cuatrecasas, J. (1964). *Cacao and its allies a taxonomic revision of the genus Theobroma*. Washigton: United States National Museum.

Cultimed. (2003). *Manual básico de microbiología*. Madrid, España: Panreac Química S. A.

D'mello, J. (1997). Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. technol* , 155-166.

de la Mota, I. (2012). *Marquéz*. Recuperado el 15 de Febrero de 2012, de <http://www.confiteriamarques.com/index.php/m,37/el-cacao>.

Despreaux, D., Leblond, A., y Adomako, D. (1996). *Sinopsis of the cocoa mettings: The varios aspects of quality in plantation, recherche, development*. . Publicaciones Adventure.

DeVries, J., Trucksess, M., y Jackson, L. (2000). *Mycotoxins and food safety*. Washington, D. C.: Kluwer Academic/ Plenum Publishers.

Enríquez, G. (1985). *Curso sobre el cultivo del cacao*. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza (CATIE).

Floss, J., Casteel, S., Johnson, G., Rottinghause, G., y Krause, G. (1994). Developmental toxicity of fumonisin in Syrian hámster. *Mycopathologia*. **128**, 33-8.

Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (1993). *El beneficio de cacao*. Mérida, Venezuela: Centro de Investigaciones Agropecuarias.

Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (1989). *Manual técnico del cultivo de cacao en Venezuela*. Caucagua, Venezuela: Centro de Investigaciones Agropecuarias.

Frank, H. (1992). Citrinin, Z. *Ernahrungswiss.*, **31**, 164-77.

García, J. (2002). Micotoxinas en rumiantes. Un problema pasado o presente. *Congreso de la Sociedad Española de Medicina Interna* , 1-8.

García, V. (2005). *Introducción a la microbiología*. 2ª Edición. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia (EUNED).

Gopalakrishnan, S., Liu, X., y Patel, D. (1992). Solution structure of the covalent sterigmatocystin-DNA adduct. *Biochemistry*. **31**(44), 10790-801.

Graziani, L., Ortiz, L., Alvarez, N., y Trujillo, A. (2003). Fermentación del cacao en dos diseños de cajas de madera. *Agronomía Tropical* , 1-9.

Gumprecht, L., Beaslet, V., Weigel, R., Parker, H., Tumbleson, M., Bacon, C., Meredith, F., y colaboradores. (1998). Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. *Toxicol-Pathol*. **26**, 777-88.

Guzmán, R. (2007). *Evaluación de los cambios ocurridos durante el beneficio del cacao a través de parámetros morfoanatómicos, fisicoquímicos y*

*nutricionales*. Caracas, Venezuela: Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Hardy, F. (1961). *Manual del cacao (Theobroma cacao)*. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas .

Harrison, L., Colvin, B., Greene, J., Newman, L., y Cole, L. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub>, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet Diagn. Invest.* **2**, 217-21.

Haschek, W., Gumprecht, L., Smith, G., Tumbleson, M., y Constable, P. (2001). Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ. Health Perspect.* **109**, 251-7.

Helfenberger, A. (1964). *Cura del cacao en pequeña escala*. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Hussein, S. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans. *Toxicology* , 101-134.

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. (1957). *Manual del curso de cacao*. Turrialba, Costa Rica: Servicios técnicos de café y cacao .

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (1984). *Bibliografía sobre cacao*. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2003). *Evaluación y adecuación de un modelo de extensión para impulsar el desarrollo rural: casos de café y cacao*. Lima, Perú: USAID.

Javed, T., Bennett, G., Richard, J., Dombrink-Kurtzman, M., Coté, L., y Buck, W. (1992). *Mortality in broiler chicks on feed amended with a *Fusarium proliferatum* cultura or with purified fumonisin B<sub>1</sub> and moniliformin*. Abst. 106<sup>th</sup> AOAC Int. Ann. Mtg. Cincinnati, OH.

Jinap, S. (1990). Characteristics of fermented and dried cocoa beans from different countries of origin. *J. Food Sci.* , 547-550.

Jones, R. (1981). *Planting date, harvest and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *A. flavus* in field corns* . *Phytopathology* .

Kalvatchev, Z., Garzaro, D., y Guerra, F. (1998). Theobroma cacao: un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria* , 1-3.

Lambert, S. (1996). *Fermentación del cacao (*Theobroma cacao*)*. Virginia, Estados Unidos: Mars, Inc.

Laneri, J. L. (2001). *Manual de procedimientos para el control microbiológico de alimentos*. Asunción, Paraguay: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Lares, M. (2007). *Diferenciación, caracterización y composición lipídica de la manteca extraída del cacao en dos de los procesos post-cosecha*. Caracas,

Venezuela: Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Le Bars, J. (1998). Strategy for safe use of fungi and fungal derivaters in food processing. *Revue Méd. Vét.* , 493-500.

Leal, F. (1999). Areas potenciales para el desarrollo de cacao en Venezuela. *Agroalimentaria* , 1-7.

Lecumberri, E., Mateos, R., Ramos, S., Alía, M., Rupérez, P., Goya, L., y colaboradores. (2006). Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación. *Nutrición Hospitalaria* , 1-7.

León, Y. (2012). *Caracterización Físico-química y fúngica de granos de cacao. Su potencial micotoxigénico y su control mediante el uso del aceite esencial de timol*. Caracas, Venezuela: Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Li M., Jiang, Y., y Bjeldanes, L. (1990). Carcinogenicity of fusarin C isolated from *Fusarium moniliforme*. *Chin. J. Cancer Res.* **2**(3),1-5.

Liendo, R. (2000). *Manejo postcosecha del cacao*. Caucagua, Venezuela: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FNIA).

Liu, X., Luo, X., y Hu, W. (1992). Studies on the epidemiology and etiology of moldy sugarcane poisoning in China. *Biomed. Environ. Sci.* **5**, 161-77.

Ludolph, A., He, F., Spencer, P., Hammerstad, J., y Sabri, M. (1991). 3-Nitropropionic acid exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol. Sci.* **18**(4), 492-8.

Magan, N., y Olsen, M. (2004). *Mycotoxins in food: Detection and control*. USA: CRC Press.

Manual de productos básicos. (1991). *Cacao fino de aroma. Estudio de la producción y el comercio mundial* . Ginebra, Suiza: Centro de comercio interno UNCTAD/GATT.

Maridueña, G., Jiménez, M., y Peralta, E. (2010). Actualización de la Micobiota Patogénica del Cacao (*Theobroma cacao*) presente en la Costa Ecuatoriana. *ESPOL-RTE* , 1-6.

Marquez, J. (2003). *Manual técnico de cosecha y beneficio del cacao*. Cuba: ACTAF.

Martínez, H. (2005). *Agroindustria y competitividad: Estructura y dinámica en Colombia* . Colombia: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) .

Maupoey, P. F. (2001). *Introducción al secado de alimentos* . Valencia, Venezuela: Universidad Politécnica de Valencia .

Mazzani, C. (1983). *Microflora de granos de maní, maíz y cacao, almacenados en Venezuela*. Caracas, Venezuela: Trabajo de Ascenso. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.

Meyer, B., Biehl, B., Said, M. B., y Samarakoddy, R. (1989). Post-harvest pod storage: A method for pulp preconditioning to impair strong acidification during cocoa fermentation in Malaysia. *J. Sci. Food Agric.* , 285-304.

Moreno, E. (1988). *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. México: UNAM.

Moreno, L., Sánchez, J., y Bermúdez, B. (1991). En *El Beneficio del cacao* (pág. 26). Honduras: Fundación Hondureña de Investigación Agrícola.

Nagaraj, R., Wu, W., Will, J., y Vesonder, R. (1996). Acute cardiotoxicity of moniliformin in broiler chickens as measured by electrocardiography. *Avian Dis.* **40**, 223-7.

Nishijima, M. (1984). Survey for mycotoxins in commercial foods, in Kurata H and Ueno Y. *Toxigenic Fungi – Their Toxins and Health Hazard*. 172-81.

Ohtsubo, K., Horiuchi, T., Hatanaka, Y., y Saito, M. (1976). Hepato- and cardiotoxicity of xanthoascin, a new metabolite of *A. candidus*. *Jpn. J. Exper. Med.* **46**(5), 277-87.

Ortiz, L., Graziani, L., y Rovedas, G. (2009). Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol . *Agronomía Tropical* , 119-127.

Osborne, L., Jones, V., Peeler J., y Larkin, E. (1988). Transformation of C3H/10T1/2cells and induction of EBV-early antigen in Raji cells by altertoxins I and III. *Toxicol. In vitro.* **2**(2), 97-102.

Ospina, J. E. (2002). *Características físico mecánicas y análisis de calidad de granos*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Pascual, M. d. (2000). En *Microbiología alimentaria* (pág. 146). Madrid, España: Díaz de Santos S. A. .

Pascual, M. d. (2005). *Enfermedades de Origen Alimentario: Su Prevención*. Madrid, España: Díaz de Santos S. A.

Passos, F. (1984). Aeration and its influence on the microbial sequence in cacao fermentations in Bahía. *J. Food Sci.* , 1470-1474.

Pettipher, G. (1990). The extraction and partial purification of cocoa storage proteins. En *Café y cacao* (págs. 23-26).

Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. *Revue Med. Vet.* , 479-492.

Portillo, E., Graziani, L., y Betancourt, E. (2005). Efecto de los tratamientos postcosechas y el índice de fermentación en la calidad del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao*) en el sur del lago de Maracaibo. *Facultad de Agronomía. LUZ* , 388-399.

Pound, F. (1934). *Criteria and methods of selection in cacao*. Imperial college of tropical agriculture. Trinidad: Second Annual Report on Cocoa Research.

Ramos, G. (1993). *Beneficio del cacao*. Mérida, Venezuela: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FNIA).

Rao, B., y Husain, A. (1985). Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet causing “kodua poisoning” in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia*. **89**, 177-80.

Raybaudi, R., Guevara, L., y Martínez, A. (2010). *Guía práctica de microbiología de alimentos*. Caracas, Venezuela: Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Red de Generación y Transferencia de Tecnología en Cacao. (1989). *Manejo de germoplasma de cacao*. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Rengel, A. (2006). *Evaluación de la micobiota y niveles de Ocratoxina A y Aflatoxina en granos de cacao*. Caracas, Venezuela: Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Reyes, H., y Reyes, L. C. (2000). *Manual Técnico para la producción de cacao*. Caracas, Venezuela: Chocolates El Rey.

Rheeder, J., Marasas, W., Thiel, P., Sydenham, E., Shephard, G., y Van D. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cáncer in Transkeim. *Phytopathology*. **83**, 353-7.

Rodríguez, P. (2007). *Efecto de los agentes alcalinizantes sobre las características físicas, químicas y físicoquímicas del licor de cacao de Chuao*. Caracas, Venezuela: Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Rodríguez, Y., y Rojas, A. (2000). *Efecto del secado sobre algunas características físicas y químicas de almendras sin fermentar de cacao criollo y forastero*. Maracay, Venezuela: Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.

Rohan, T. (1964). Precursors of chocolate. *Journal Food Science* , 1-3.

Sagardoy, M., y Mandolesi, M. (2004). En *Biología del suelo* (pág. 40). Argentina: Universidad Nacional del Sur.

Salazar, M., y Guaita, C. (1985). *Caucagua y Cayapa: Importancia del comercio cacaotero en la implantación y desarrollo de la región*. Caracas, Venezuela: Trabajo de Grado. Facultad de Humanidades y Educación. Universidad Central de Venezuela.

Samson, R. (1995). *Introduction of Food Borne Fungi*. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Sánchez, H. (1995). *Caracterización del sistema de producción de cacao*. Caucagua, Venezuela: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FNIA).

Sánchez, M., Gil, J., Bisbal, F., Ramón, D., y Martínez, P. (2008). En *Mycobiota and micotoxin producing fungi from cocoa beans* (págs. 125, 336-340). *International Journal of Food Microbiology*.

Schrader, T., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I., y Vijay, H. (2001). Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation

using the Ames *Salmonella* test. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **21**(4). 261-74.

Scott, P. (1994). *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. *Mycotoxins in Grain*. St Paul, MN: Eagan Press.

Scudamore, K., Hetmanski, M., Clarke, P., Barnes, K., y Startin, J. (1996). Analytical methods for the determination of sterigmatocystin in cheese, bread and corn products using HPLC with atmospheric pressure ionization mass spectrometry detection. *Food Addit. Contam.* **13**(3), 343-58.

Senanayake, M. (1997). Effect of different mixing intervals on the fermentation of cocoa beans. *Sci. Food Agric.* , 42-48.

Shane, S. (1994). *Economic issues associated with aflatoxins*. San Diego, Estados Unidos: Academic Press.

Sharman, M., Gilbert, J., y Chelkowski, J. (1991). A survey of the occurrence of the mycotoxin moniliformin in cereal samples from sources worldwide. *Food Addit. Contam.* **8**(4), 459-66.

Shephard, G., Thiel, P., Stockenstrom, S., y Sydenham, E. (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Int.* **79**, 671-87.

Silva, M. d. (2006). En *Técnico especialista en laboratorio* (pág. 466). Madrid, España: MAD.

Smith, E., Kubena, L., Braithwaite, C., Harvey, R., Phillips, T., y Reine, A. (1992). Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poult. Sci.* **71**(7), 1136-44.

Sorenson, W., Tucker, J., y Simpson, J. (1984). Mutagenicity of the tetramic mycotoxin cyclopiazonic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(6), 1355-7.

Soria, J. (1973). *Obtención de clones de cacao*. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Speijers, G., y Franken, M. (1989). *Subacute and subchronic toxicity of patulin*. Rome: Consiglio Nazionale Delle Ricerche.

Stevenson, C. (1993). *Manual para análisis de cacao en laboratorio*. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Sydenham, E., Shephard, G., Thiel, P., Marasas, W., y Stockenstrom, S. (1991). Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1900-3.

Takahashi, C., Sekita, S., Yoshihira, K., y Natori, S. (1976). The structure of toxic metabolites of *Aspergillus candidus*. *Chem. Pharm. Bull.* **24**(10), 2317-21.

Terao, K. (1983). Sterigmatocystin: a masked potent carcinogenic mycotoxin. *J. Toxicol- Toxin Rev.* **2**(1), 77-110.

Toro, D. R. (2005). En *Manual para la introducción al laboratorio de microbiología* (pág. 13). Colombia: Universidad de Caldas.

Torres, O. (2001). *Efecto del tiempo transcurrido entre la cosecha y el desgrane sobre algunas características físicas y químicas del cacao durante la fermentación*. Maracay, Venezuela: Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.

Tortora, G. (2007). *Introducción a la microbiología*. Madrid, España: Médica Panamericana.

Urquhart, D. (1963). *Cacao (Theobroma cacao)*. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Voss, K., Norred, W., Hinton, D., Cole, R., y Dorner J. (1990). Subchronic oral toxicity of cyclopiazonic acid (CPA) in male Sprague-dawley rats. *Mycopathología*. **110**(1), 11-18.

Warham, E. (1971). En *Ensayos para la semilla de maíz y de trigo* (pág. 10). México: CAB International.

Wood, G., y Laas, R. (1985). *Cocoa*. London, UK: Longman Press.

Wouters, M., y Speijers, G. (1996). Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food, Patulin. *WHO Food Additives Series*. **35**, 377-402.

Xu, G., Lu, C., Mu, X., Chen, J., Chen, Y., Gu, Y., Wu, Y., y colaboradores. (1999). A study on the production of citrinin by *Monascus* spp., *Arch. Lebensmittelhyg.*, **50**(4/5), 88-91.

Yekeler, H., Bitmis, K., Ozcelik, N., Doymaz, M., y Calt, M. (2001). Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicol. Pathol.* **29**(4), 492-7.

Zhang, H., y Li, J. (1989). Study on toxicological mechanism of moniliformin. *Acta Microbiol. Sinica.* **29**, 93-100.