Innovación tecnológica en cacao andino

(ATN – RF 16109 RG)

Informe Final

ANGÉLICA SANDOVAL ALDANA

FONTAGRO

Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directores Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Angélica Sandoval Aldana

Copyright © 2021 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:
FONTAGRO
Correo electrónico: fontagro@fontagro.org
www.fontagro.org

Tabla de Contenidos

Resumen **8**

Antecedentes **10**

Objetivos **12**

Metodología **13**

COMPONENTE 1 Zonificación de ambientes y materiales de cacao de calidad diferenciada **13**

Colecta y caracterización de materiales de calidad diferenciada 13

- **Evaluación morfológica** 13
- **Fermentación y secado** 14
- **Polifenoles Totales** 14
- **Actividad antioxidante** 14

Evaluación sensorial 15

COMPONENTE 2 Manejo agronómico **15**

Colombia 15

Perú 16

Pruebas en vivero - Colombia 18

Diseño experimental y análisis estadístico 19

Pruebas en vivero – Perú 19

COMPONENTE 3. Innovación en la etapa de fermentación y desarrollo de nuevos productos **20**

Selección de microorganismo 20

Desarrollo de protótipo 21

Obtención de extractos de Flavonoides 23

Obtención de encapsulados por secado por aspersión 23

Liofilización 24
Caracterización fisicoquímica 24
Componente 4: Transferencia de conocimiento y tecnología 24
Resultados 25
Componente 1. Zonificación de ambientes y materiales de cacao de calidad diferenciada 25
Localización y Caracterización Biofísica de Sitios de Materiales de Calidad Diferenciada 25
Selección y Caracterización de Zonas Homólogas para Perú 29
Capacidad de uso mayor de suelos (cum) 30
Cobertura vegetal 31
Evaluación química 35
Evaluación de polifenoles totales 35
Materiales de calidad Perú 37
Contenido de polifenoles y actividad antioxidante 39
Análisis sensorial 40
Componente 2. Manejo agronómico 41
Colombia 41
Perú 42
Efecto de los tratamientos sobre el contenido de cadmio foliar 44
Efecto de las dosis crecientes de cadmio en la concentración de este elemento en el tejido vegetal de cinco genotipos de cacao 45
COMPONENTE 3. Innovación en la etapa de fermentación y desarrollo de nuevos productos 46
Cuantificación de poblaciones microbianas 46
Desarrollo del Prototipo de fermentación ecológico 48
Pruebas de ensayo- Perú 49
Rendimiento extracción de flavonoides 51
Polifenoles totales 52
Capacidad antioxidante (CA) 53
Componente 4. 55
Indicadores Técnicos 59
Hallazgos Destacados 60

Discusión **61**
Componente 1. Zonificación de ambientes y materiales de cacao de calidad diferenciada 61
Componente 2. Manejo agronómico 62
Componente 3. Innovación y desarrollo de nuevos productos 63
Componente 4. Transferencia de conocimiento y tecnología. 65
Conclusiones **66**
- RECOMENDACIONES 69

Referencias Bibliográficas **70**
Instituciones participantes **77**

Lista de gráficos

Gráfico 1. Localización de los municipios en los departamentos del Tolima (superior) y Huila (inferior) seleccionados para el muestreo de suelos cacaoteros 16
Gráfico 2. Localización de las provincias de Tocache y Mariscal Cáceres en el departamento de San Martín, y el departamento de Cusco, seleccionados para el muestreo de suelos cacaoteros. 17
Gráfico 3. Distribución espacial de los materiales de calidad diferenciada identificados para los departamentos de Tolima y Huila 26
Gráfico 4. Diagrama de flujo metodológico definido para la identificación de zonas homólogas para los cacaos con calidad diferenciada..... 27
Gráfico 5. Distribución de las zonas homólogas de los lugares donde se identificaron materiales de calidad diferenciada (cultivo de cacao) en el departamento del Tolima. 28
Gráfico 6. Distribución de las zonas homólogas de los lugares donde se identificaron los materiales de calidad diferenciada en el departamento del Huila. 29
Gráfico *7*. Mapa de Uso Actual de Suelos a) Margen Derecha los distritos de San Martin y Margen izquierda los distritos de Cusco 30
Gráfico 8 Mapa de Capacidad de Uso Mayor a) Margen Derecha los distritos de San Martin y Margen izquierda los distritos de Cusco 31
Gráfico *9* Mapa de Cobertura Vegetal a) Margen Derecha los distritos de San Martin y Margen izquierda los distritos de Cusco 32
Gráfico 10. Índice de grano de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia 34
Gráfico 11. Contenido de grasa de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia 34
Gráfico 12. Polifenoles totales de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia 35
Gráfico 13. Correlación entre Polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH) de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia 36
Gráfico 14. Capacidad antioxidante (ORAC) de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia 36
Gráfico 15. Perfil sensorial de 8 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia. Lado derecho departamento del Tolima, lado izquierdo departamento del Huila 37
Gráfico 16. Evaluación sensorial frutos árbol CC007 40
Gráfico 17. Evaluación sensorial frutos árbol CCWS 41
Gráfico 18. Evaluación sensorial frutos del árbol CFA15 41
Gráfica 19. Contenido de cadmio disponible en el suelo para varios puntos de muestreo en diferentes municipios del departamento del Huila y Tolima en Colombia 42
Gráfica 20. Contenido de cadmio en granos de cacao de diferentes municipios del departamento del Huila y Tolima en Colombia. 42
Gráfico 21. Contenido de cadmio disponible en el suelo para varios puntos de muestreo en diferentes localidades productoras de cacao en Perú. 43
Gráfico 22. Contenido de cadmio en grano de cacao para diferentes localidades productoras de

Perú. 43
Gráfica 23. Efecto de la aplicación de diferentes niveles de cadmio al sustrato de siembra sobre los contenidos de cadmio foliar en plántulas de cacao de seis meses de edad. 44
Gráfico 24. Efecto de la aplicación de diferentes tipos de enmiendas al sustrato de siembra sobre los contenidos de cadmio foliar en plántulas de cacao de seis meses de edad. 45
Gráfico 25. Dinámica poblacional microbiana del proceso de fermentación espontanea de granos de cacao. 47
Gráfico 26. Registro de temperatura en modelo 4, pruebas preliminares en Colombia..... 49

Resumen

El proyecto Innovación tecnológica en cacao andino, se ejecutó en los países de Perú y Colombia, en específico se trabajaron dos regiones cacaoteras de Cuzco y San Martín, en Perú; y los departamentos de Tolima y Huila, en Colombia. Para estas regiones se realizó un sistema de información geográfica (SIG) que incluyó información edafoclimática y la georreferenciación de materiales de calidad diferenciada colectados con apoyo de los productores. A estos materiales se les realizó la caracterización fisicoquímica y organoléptica. Se definieron materiales por región que pueden ser considerados para futuros procesos de siembra, por su buena productividad y calidad diferenciada en sabor, enfocando su uso en la industria chocolatera de cacao fino y de aroma.

En la parte agronómica se realizó la caracterización de los suelos con el fin de identificar presencia de cadmio, este metal pesado es una barrera para la exportación considerando los límites máximos permitidos por la Unión Europea para productos derivados de cacao. Se encontró que algunos suelos de la zona sur del departamento del Tolima superan el límite permitido de presencia de este metal. A nivel vivero se trabajaron dos experimentos con el fin de identificar 1) efecto de la variedad en la resistencia a la presencia de este metal; se encontró que el material CCN51 presentó menor adsorción, 2) tratamientos para enmiendas al suelo que disminuyeran la adsorción de cadmio; la mezcla de cal dolomita con micorriza fue un tratamiento que disminuyó la adsorción medida a nivel de hoja.

En mejoras del proceso de fermentación se logró un prototipo ecológico para fermentación del grano, trabajando con llantas recicladas que garantizan conservar la temperatura, de fácil construcción por los productores y económicamente asequible. De igual forma, se logró la identificación y colecta de microorganismos precursores de aroma para ser utilizados como cultivos iniciadores, se identificó que su uso acelera el proceso de fermentación. Para cada país se tiene una colecta de microorganismos identificados por especie para futuros trabajos de resistencia y encapsulación.

Finalmente, se logró la extracción de los compuestos flavonoides presentes en la semilla de cacao sin fermentar, se estudió la encapsulación por secado por aspersión y liofilización. A estos encapsulados se les determinó flavonoides presentes y actividad antioxidante. La técnica de liofilización generó los encapsulados con mayor actividad antioxidante, pero su costo es mayor debido al largo tiempo de procesamiento. Se requiere continuar investigado para el escalado de este producto rico en flavonoides pues se logró la estandarización a nivel laboratorio.

Los resultados de esta investigación fueron socializados en dos talleres presenciales, año 2019 y II ciclos de conferencias virtuales realizados en los años 2020 y 2021, debido a las restricciones de movilización por la pandemia del COVID -19 fue necesario incluir esta forma de entrega de resultados. Sin embargo, existe un interés de la comunidad beneficiara y académica por los avances realizados en esta investigación.

Palabras claves: cacao, cadmio, fermentación, flavonoides, microorganismos

Abstract

Technological Innovation in Andean cacao project was carried out in Peru and Colombia, specifically in two cocoa producers regions of Cuzco and San Martín, in Peru; and Tolima and Huila departments in Colombia. For these regions, a geographic information system (GIS) was carried out that included edaphoclimatic information and the collection of materials of differentiated quality. It was carried out the physicochemical and organoleptic characterization. Some materials were defined by region future planting processes, due to their good productivity and differentiated quality in flavor, focusing their use in fine and aroma chocolate industry.

In the agronomic part, the characterization of the soils was carried out in order to identify the presence of cadmium, this heavy metal is a barrier for exportation process considering the maximum limits allowed by the European Union for products derived from cacao. It was found that some soils in the southern zone of the department of Tolima exceed the permitted limit for the presence of this metal. At the greenhouse level, two experiments were carried out to identify 1) effect of the variety on the resistance to the presence of this metal, finding that the material CCN51 adsorb less, 2) soil amendments treatments that decrease the adsorption of cadmium, where the mixture of Dolomite lime with mycorrizhae was a treatment that decreased the adsorption measured at the leaf level.

In improvements to the fermentation process, an ecological prototype was achieved for fermentation of the grain, working with recycled tires that guarantee to preserve the temperature, easy to build by the producers and economically affordable. Similarly, the identification and collection of aroma precursor microorganisms to be used as starter cultures was achieved, it was identified that their use accelerates the fermentation process. For each country there is a collection of microorganisms identified by species for future resistance and encapsulation work.

Finally, the extraction of the flavonoid compounds present in the unfermented cacao bean was achieved, the encapsulation by spray drying and lyophilization was studied. Flavonoids present and antioxidant activity were determined for these encapsulates. The lyophilization technique generated the encapsulates with the highest antioxidant and cardioprotective activity. It is necessary to continue working on standardization on a larger scale to obtain this product rich in flavonoids since standardization was achieved at the laboratory level.

The results of this research were socialized in two workshops, year 2019 and II virtual conference cycles held in 2020 and 2021, due to mobilization restrictions due to the COVID-19 pandemic, it was necessary to include this form of delivery of results. However, there is an interest from the beneficiary community and the academic community for the advances made in this research.
Key words: cacao, cadmium, fermentation, flavonoids, microorganisms.

Antecedentes

En la economía cacaotera mundial de los últimos años han aparecido tendencias importantes, a la vez que ha persistido un gran problema de antaño. Las nuevas tendencias se refieren a cambios en la demanda de chocolate —algunos bastante drásticos—, mientras que el antiguo problema es el de la gran miseria en la que viven muchos productores de cacao. Estos son los dos grandes retos a los que se enfrenta la economía cacaotera mundial: satisfacer la mudable demanda de los consumidores y aumentar considerablemente los ingresos de los productores de cacao (ICCO, 2007).

En América, el cacao es cultivado desde México hasta Brasil, sin embargo, son poco significativas las cantidades producidas y exportadas, comparadas con otros continentes. Aproximadamente el 90% de la producción mundial es cultivada por pequeños propietarios, lo que muestra el bajo nivel de organización del sector. Estos agricultores recurren a intermediarios para comercializar el grano, quienes lo venden a las grandes compañías. Unas pocas compañías multinacionales dominan tanto la transformación como la producción de chocolate. La clave del éxito en la comercialización internacional del cacao es su calidad integral, es decir una combinación de las características deseadas por el productor, exportador, transformador y consumidor donde también influyen la oferta y la demanda y las condiciones impuestas por normas sanitarias y de clasificación (Amores, 2004). La calidad del cacao no se restringe ahora a la determinación de los contenidos de grasa, rendimiento, sino que incluye características sensoriales (sabor, aroma), salud humana (compuestos fenólicos) y consciencia ambiental (sellos orgánicos y ecológicos) y social (comercio justo) (INIAP, 2005) Adicionalmente en los últimos años se han creado barreras para la exportación con nuevas regulaciones internacionales que restringen el uso de cacao de origen americano, por la presencia de metales pesados como el cadmio, el cual es característico de los suelos volcánicos andinos.

Las exigencias de cada mercado determinan los parámetros de calidad del cacao que incluye apariencia del grano, grado de fermentación, humedad, así como ausencia de materiales extraños, mohos, insectos, entre otros. Por otro lado, se encuentran las características sensoriales (sabor y aroma), importante para cacao de exportación ya que ausencia de amargor y astringencia del grano son requisitos fundamentales para la elaboración de chocolates finos (Armijos, 2002); en este tipo de chocolates se busca encontrar delicados matices de sabor, lo cual depende del origen de los materiales y un adecuado proceso de fermentación. Así mismo, las propiedades funcionales del cacao han emergido como la mayor fuerza de consumo, como respuesta al deseo de las poblaciones de poder ejercer un mayor control sobre la salud en general, deteniendo el envejecimiento, previniendo las enfermedades y mejorando el bienestar (Hollenberg, 2006).

Los avances en nuevos productos y los llamados “alimentos funcionales” han tenido mucho que ver en la tendencia alcista del mercado de la confitería. En los últimos tiempos se vienen

realizando más estudios sobre las propiedades nutritivas y para la salud del cacao y el chocolate. Los resultados indican que los flavonoides del cacao podrían inhibir la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (el denominado “colesterol malo”), contribuyendo así a la prevención de enfermedades cardiovasculares. Además, se ha demostrado que el alto contenido de antioxidantes del cacao reduce el riesgo de cáncer. La demanda de chocolate negro y de alto contenido de cacao, en concreto, ha surgido en respuesta a estos hallazgos positivos. Lecumberri et al. (2006) asegura que la ingestión de seis gramos al día de chocolate durante dos semanas reduce la presión arterial y mejora la función del endotelio de las arterias, además la formación de óxido nítrico favorece la dilatación de estas disminuyendo la probabilidad de presentar trombosis. Cabe resaltar que este tipo de investigaciones han venido siendo lideradas por Europa en programas desarrollados por grandes productoras de licor de cacao donde ya se encuentran el mercado suplementos alimenticios. En abril de 2015, la Comisión Europea aprobó la declaración de salud de flavonoides de cacao presentado por Barry Callebaut, bajo la premisa que “los flavonoides de cacao ayudan a mantener la elasticidad de las venas lo que contribuye a mejorar el flujo de sangre” (Regulation (EU) 2015/539).

Objetivos

Objetivo General

Establecer innovaciones tecnológicas para los productores de cacao de áreas andinas enfocados a la mejora de calidad del grano de cacao a nivel de producción, procesamiento y valor agregado para lograr la diferenciación y el acceso a nuevos mercados.

Objetivos específicos

- Identificar ambientes y materiales de cacao de calidad diferenciada a nivel sensorial y funcional.
- Desarrollar estrategias de manejo agronómico para disminuir la asimilación de cadmio en los frutos de cacao, a partir de la determinación de asociaciones estadísticas entre propiedades edafológicas y contenidos de cadmio en los tejidos vegetativos y reproductivos de la planta de cacao.
- Generar mejoras tecnológicas en la etapa de fermentación y desarrollo en nuevos productos.
- Transferir los conocimientos a productores y comunidad académica

Metodología

COMPONENTE 1 Zonificación de ambientes y materiales de cacao de calidad diferenciada

Para el desarrollo y la ejecución del proyecto, se recopiló información primaria y secundaria de acceso libre de las diferentes entidades públicas y privadas, tales como:

- El Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SEMANHI), https://www.senamhi.gob.pe/?&p=estaciones,
- Se tomó la base cartográfica de las unidades de suelo para los departamentos de Tolima y Huila a escala 1:100.000 disponible en formato digital en http://geoportal.igac.gov.co/es/contenido/datos-abiertos-agrologia del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) para una posterior proyección y revisión en los Sistemas de Información Geográfica (SIG).
- La Autoridad Nacional del Agua (La ANA), mediante su visor se realiza las descargas cartográficas. http://snirh.ana.gob.pe/observatorioSNIRH/.
- Y otros medios digitales como datos Abiertos y datos Climáticos Globales como son PISCO (https://www.senamhi.gob.pe/?p=observacion-de-inundaciones) y WorldClim (https://www.worldclim.org/data/index.html,).

Los softwares utilizados para el presente estudio fueron:

- Software Rstudio, es un entorno de desarrollo integrado para el lenguaje de programación R, dedicado a la computación estadística y de gráficos. Para el estudio se utilizó para la elaboración de scripts de los mapas temáticos.
- Software ArcMap 10.5, es una interfaz donde se visualiza, almacena, edita y explora los datos SIG, la cual a consistido en generar de una base de datos (geodatabase) que contengan toda información espacial de las 2 zonas productoras de Cacao.

Colecta y caracterización de materiales de calidad diferenciada

En cada uno de los puntos seleccionados se realizó la toma de muestras de los frutos, a través de inspección visual e información de los agricultores. Cada predio fue georreferenciado. Una vez se recolectaron los frutos o mazorcas, estos se almacenaron, para posteriormente ser transportados hasta el laboratorio. Una vez en este, se procedió a romper la corteza del fruto y realizar las respectivas evaluaciones. A cada material se le realizaron las siguientes pruebas:

- **Evaluación morfológica**

La evaluación fisicoquímica se realizó con base a descriptores cualitativos y cuantitativos para generar un perfil para cada material evaluado. Para ello, se utilizaron los protocolos publicados

por CATIE (2012).

- **Fermentación y secado**

La masa de cacao de cada material vegetal se fermentó independientemente usando recipientes plásticos con una capacidad de 800 g. Estas muestras se mantuvieron a una temperatura controlada de 35 ° C durante los primeros tres días, y luego la temperatura se incrementó a 45 °C por dos días y finalmente a una temperatura de 50°C hasta terminar la etapa de fermentación. Después de la fermentación, la masa de cacao se extendió sobre marquesina para secar hasta alcanzar el 7% de contenido de humedad.

- **Polifenoles Totales**

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad para eliminar los radicales libres. Para la determinación de polifenoles totales se tomaron 0.5 g de semilla previamente seca triturada, la cual fue mezclada en 2 ml de hexano y se agitó durante 1 h, el sobrenadante resultante fue desechado, esta acción se realizó por triplicado. Una vez la semilla estuvo desengrasada se tomaron 0.15 g de semilla y se mezclaron con 2.25 ml de 2- propanol en tubos de ensayo y agitados por 1 hora, después de pasado este tiempo se tomó el sobrenadante y este fue filtrado en una membrana de 40 µm. Una vez obtenido el extracto se toman 20 µl de este y se mezcló con 800 µl de agua destilada, de dicha muestra diluida se toman 25 µl y se le agregan 187.5 µl de agua destilada y 12.5 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu, después de 8 minutos se adiciona 25 µl de Na_2CO_3 (10%) con agitación continua, incubado por 1 hora en refrigeración y oscuridad. Por otra parte, se usó ácido gálico como patrón de referencia para la curva de calibración con diluciones entre 0-100 µg/ml, para determinar la concentración de ácido gálico asociada a una absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro.

- **Actividad antioxidante**

FRAP:

Se usa el extracto mencionado en el proceso de detección de polifenoles totales, a dicho extracto se le añadieron 280 µL de extracto diluido y 2,1 µL de FRAP y luego se incubaron durante 4 min a 37 ° C. La absorbancia se leyó a 593 nm usando una celda de cuarzo. Una curva de calibración fue preparado usando diferentes concentraciones de Trolox (0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mmol / L) y FRAP, los datos se expresaron como equivalente en miligramos de Trolox (mgET) por gramo de material de muestra seco (mgET / g de muestra seca).

DPPH:

Se utilizó el extracto que se explica en el procedimiento de detección de polifenoles totales. Para la determinación del coeficiente de inhibición del radical DPPH se prepararon 10 ml de solución stock de DPPH a 100 µM en metanol al 99% de pureza, se agitó hasta la solubilización completa del compuesto y se almacenó a 4°C protegido de la luz. A partir de esta solución stock se preparó 50 ml de DPPH a 20 µM en metanol al 99% de pureza. Las muestras son diluidas en una relación 1:20 con agua destilada. Se tomaron 50 µl de la muestra diluida y se le agregaron 200 µl de la solución de DPPH. Se realizó una lectura en un espectrofotómetro de UV/VIS a una longitud de onda de 517 nm con un tiempo de 30 minutos. Se uso para la curva de calibración estándar de

Trolox, con una concentración estándar entre 20 a 200 ppm.

ORAC:

Se utiliza el extracto realizado para la detección de polifenoles totales. La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato 75 mM (pH 7.4) y la mezcla de reacción final fue de 200 µL. Antioxidante (20 µl) y fluoresceína (120 µl; 70 nM, concentración final). La mezcla se preincubó en ausencia de luz durante 15 min a 37 °C. Solución de AAPH (60 µl; 12 mM, concentración final) se añadió rápidamente utilizando una pipeta multicanal. La microplaca fue colocada inmediatamente en el lector y la fluorescencia registrada cada minuto durante 90 minutos. La microplaca se agitó automáticamente antes de cada lectura. El blanco (FL + AAPH) usado fue tampón fosfato en lugar del solución antioxidante y ocho soluciones de calibración con Trolox (1-8 µM, concentración final). Las muestras se realizaron por triplicado.

Evaluación sensorial

Se realizó la evaluación de cada una de las fermentaciones con el apoyo del panel sensorial en entrenamiento de la Universidad del Tolima y en la Universidad Nacional Agraria la Molina. Durante las dos sesiones realizadas, se analizaron 4 muestras de licores de cacao, evaluando las características de: i) sabores básicos como: la acidez, amargo, astringencia, ii) sabores específicos como: floral, frutal, nuez y iii) sabores adquiridos como: crudo o verde, entre otros.

COMPONENTE 2 Manejo agronómico

Colombia

Los estudios se llevaron a cabo en los municipios de Chaparral, Ataco y Planadas, ubicados al sur del Tolima y en el municipio de Mariquita al norte del mismo departamento. En el departamento del Huila, los puntos de estudio se ubicaron en los municipios de Gigante y Campo Alegre (Gráfico 1). Estos municipios son mayores productores de cacao en cada uno de sus departamentos. En el departamento del Tolima se tiene que el municipio de Chaparral está localizado a una altura de 980 m.s.n.m, con una temperatura promedia de 26°C.

Para el caso departamento del Huila, el municipio de Gigante tiene una superficie de 626 km^2, de los cuales 622 pertenecen a la zona rural. Además de una altitud media de 809 msnm y la temperatura promedia es de 24 °C. El municipio de Campoalegre, está localizado a 525 m.s.n.m, próximo a Gigante y Neiva. Tiene una extensión de 661 km^2 y una población de casi 35.000 habitantes. La temperatura promedia es de 27 °C.

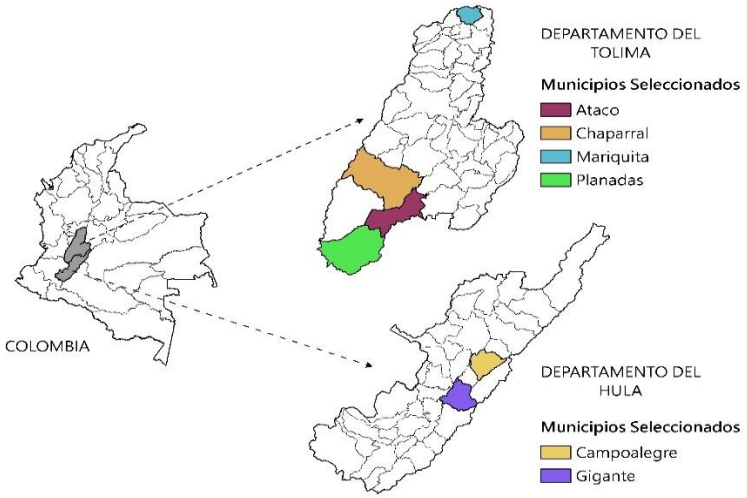


Gráfico 1. Localización de los municipios en los departamentos del Tolima (superior) y Huila (inferior) seleccionados para el muestreo de suelos cacaoteros.
Fuente: Autores

Perú

Este estudio se realizó en las provincias de Tocache y Mariscal Cáceres en el departamento de San Martín y en el departamento del Cusco. La Provincia peruana de Mariscal Cáceres es una de las diez que conforman el departamento de San Martín. Tiene una superficie de 14.498 km^2 y una población total de 64600 habitantes. Está ubicada en las coordenadas 7°10’36” S 76°43’44” O. De otra parte, ubicada a 497 m.s.n.m, Tocache es una ciudad peruana ubicada en la cuenca alta del río Huallaga, al sur de la Región San Martín. Está ubicada en las coordenadas 8°11’19” S 76°30’37” O. La provincia de Tocache, de la cual es su capital, se ubica en la cordillera de los Andes, con un relieve altamente heterogéneo, con diversas características de pendiente y altitud.

En el caso del departamento de Cusco este cuenta con una superficie de 71.986 km^2 y una población de 1.206 millones de habitantes. La temperatura media en la capital es de 12 °C siendo la máxima de 18 °C y la mínima alrededor de 4 °C más o menos. En la selva amazónica es tropical (Gráfico 2).

Como primer paso se determinó a partir de consideraciones teóricas las zonas potenciales de acumulación de cadmio en los suelos de producción cacaotera de los departamentos del Tolima y del Huila, en Colombia, y de los departamentos de San Martin y Cusco, en Perú.

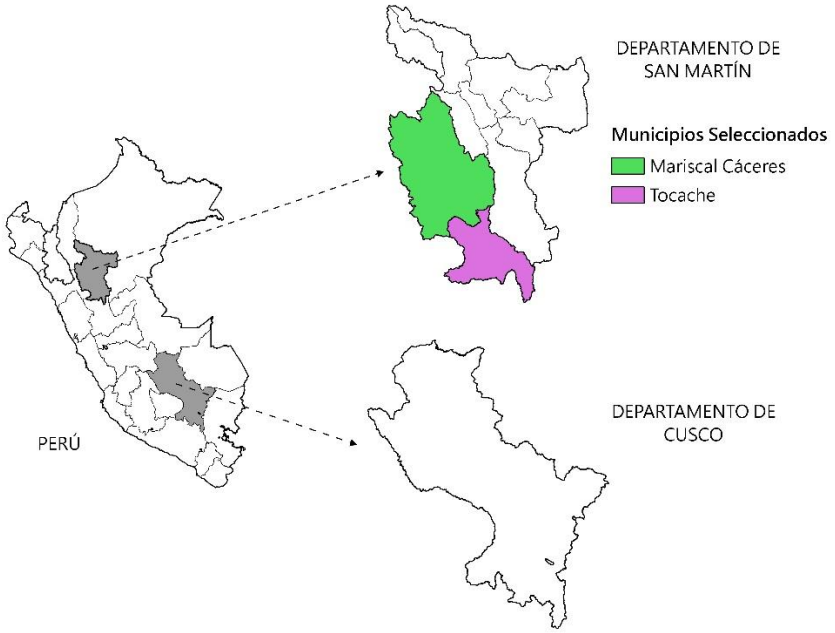


Gráfico 2. Localización de las provincias de Tocache y Mariscal Cáceres en el departamento de San Martín, y el departamento de Cusco, seleccionados para el muestreo de suelos cacaoteros.
Fuente: Autores

Una vez se tuvo una visualización de la zona se definieron los puntos a muestrear, en el caso de Colombia se priorizaron 49 puntos de muestreo ubicados en los departamentos de Tolima y Huila. Distribuidos de la siguiente manera: Ataco (4 muestras), Chaparral (12 muestras), Planadas (3 muestras), Mariquita (21 muestras) por el departamento del Tolima y Gigante (4 muestras), Campo Alegre (5 muestras) por el departamento del Huila.

Para el caso de Perú se definieron 90 puntos de muestreo ubicados en los departamentos de Cusco y San Martin. Distribuidos de la siguiente manera: La Pólvora y Tocache (32 muestras), Mariscal Cáceres (26 muestras), por departamento de San Martin y La Convención (32 muestras), por el departamento de Cusco.

En cada uno de los puntos seleccionados se realizó la toma de muestras pareadas de suelo y frutos, a través de inspección visual e información de los agricultores, donde se buscó que los árboles en cada uno de los puntos de muestreo fueran genéticamente similares. Cada punto de muestreo fue georreferenciado. Durante esta visita se realizó una encuesta al productor con el fin de obtener información sobre los aspectos de manejo agronómico de los cultivos e historia del lote de siembra.

Para el muestreo de granos de cacao, se seleccionaron por cada árbol, uno o dos frutos en estado de cosecha, todos con similar nivel de maduración. Los frutos fueron almacenados en bolsas

plásticas debidamente rotuladas, para posteriormente ser transportados hasta el laboratorio. Una vez en este, se procedió a romper la corteza del fruto, recolectar la semilla, y retirar el mucilago. Luego se llevó la muestra a secado en incubadora a 60°C por 24 horas. Una vez secadas las semillas se procedió a retirar la testa manualmente. El contenido de cadmio en los granos secos y en la testa de las semillas se determinó por espectrometría de absorción atómica, horno de grafito.

Para determinar si existía algún tipo de correlación estadística entre la concentración de cadmio en los tejidos del grano de cacao y varias variables edáficas, se desarrolló un análisis de regresión múltiple jerárquica, previa comprobación del cumplimiento de supuestos estadísticos, para lo cual se utilizó el software IBM SPSS v25. Igual aproximación se siguió para determinar asociaciones estadísticas entre los niveles de cadmio disponible en el suelo y varias variables edáficas.

Pruebas en vivero - Colombia

En Colombia se trabajó con semillas de CCN51. Una vez germinadas, las semillas se sembraron en bolsas de polietileno negro de aproximadamente 5 kg, que contenían sustratos tratados de forma diferencial, de acuerdo con la siguiente tabla, que detalla los factores sometidos a estudio.

Tabla 1. Tratamientos en estudio en vivero

Dosis de cadmio (ppm)	Enmienda*
0	Suelo sin tratamiento
1.0	Suelo + cal agrícola
2.5	Suelo + cal dolomita
5.0	Suelo + $MgSO_4$
10.0	Suelo + micorrizas
	Suelo + micorrizas+ cal dolomita

La cal dolomita y la cal agrícola se aplicaron en dosis de 1.5 t/ha y los hongos micorrícicos arbusculares en dosis de 1 g/planta

La combinación de los dos factores de estudio (dosis de cadmio y enmiendas) produjeron 30 tratamientos, para cada uno de los cuales se dispusieron de 10 repeticiones. En el caso de los tratamientos que se adicionó cadmio al suelo, éste se aplicó como una solución de cloruro de cadmio ($CdCl_2$), un mes antes de la siembra. Esta misma dosis se aplicó en forma periódica mensual, de acuerdo con el tratamiento. Las plántulas permanecieron por seis meses en condiciones de vivero bajo regímenes de riego adecuados, período en el que se aplicó fertilizante sólido NPK, en una única dosis, de acuerdo con los resultados del análisis de suelos. Se llevó un registro quincenal de las variables: altura de plantas, número de hojas y diámetro del tallo. Las variables medidas al final de los ensayos fueron: materia fresca del tallo (MFT), materia fresca de la raíz (MFR), altura de planta (AP) y materia seca por hoja (MFH), como variables de crecimiento y desarrollo de las plántulas. Se determinó también, una vez cosechadas las plantas, el contenido

de cadmio foliar utilizando espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito. Los análisis se hicieron en el laboratorio Laserex de la Universidad del Tolima.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño utilizado correspondió a un diseño completamente aleatorizado con 30 tratamientos (6 tipos de enmiendas x cinco dosis de cadmio) y 10 repeticiones por tratamiento. Para el análisis de cadmio foliar en laboratorio, se mezclaron las hojas de las 10 plantas en cada tratamiento, y se dividieron aleatoriamente en tres muestras, cada una de las cuales se tomó como una repetición. Los datos de los resultados se analizaron a través de un análisis multivariado de varianza; y las medias producidas por los tratamientos para las diferentes variables de estudio se compararon a través de una prueba de Tukey, en los dos casos con un nivel de significancia del 0.05. El procesamiento de los datos se efectuó con el software IBM SPSS 25.

Pruebas en vivero – Perú

Este estudio se realizó en el vivero del fundo 'La Bretaña' de la empresa Agrícola La Bretaña localizada en San Ramón – Chanchamayo - Junín, selva central del Perú, donde las condiciones climáticas corresponden al clima tropical húmedo. El clima se clasifica como Af., siendo la temperatura máxima promedio de 32 °C, la mínima de 17 °C y una media de 24.8 °C.

Los tratamientos correspondieron a cinco genotipos de cacao CCN-51, ICS-60, ICS-95, POUND-7 y VRAE-99, cuatro dosis de cadmio: 0, 50, 100 y 150 ppm, haciendo un total de 20 tratamientos (ver Tabla 2). La fuente de cadmio usado fue sulfato de cadmio ($3CdSO_4.8H_2O$); compuesto por: 98.0 % de Cd, pH 3.0-6.0, Cl ≤ 0.001%, N ≤0.0005%, Ca≤ 0.005%, Cu ≤ 0.0005 %, Fe ≤ 0.0005%, K ≤ 0.01%, Na≤ 0.005%, Pb ≤ 0.002% y Zn ≤ 0.002%. El cadmio fue aplicado en solución, preparado en agua desionizada y según las dosis previamente determinadas (Tabla 2).

Tabla 2. Genotipos de cacao y dosis de cadmio usados para la contaminación del sustrato

FACTORES		NIVELES	GENOTIPOS
GENOTIPOS	A	a1	CCN-51
		a2	ICS-60
		a3	ICS-95
		a4	POUND-7
		a5	VRAE – 99
DOSIS	B		DOSIS (mg/kg)
		b0	0
		b1	50
		b2	100
		b3	150

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de la planta de cacao, se evaluó la altura (cm), número de hojas, diámetro de tallo (cm), en tres oportunidades. Al final del experimento se determinó el peso fresco y peso seco de la parte aérea (hojas y tallos) y raíces y

la longitud de la raíz más larga. Para conocer el efecto de los tratamientos en la absorción del cadmio por la planta, se analizó el contenido de cadmio en las hojas y en las raíces, al final del ensayo. En el caso de las raíces, se usaron todas por unidad experimental; mientras que para las hojas se tomaron muestras de cada unidad experimental, siguiendo los lineamientos propuestos por el MINAGRI (2018) y MINAGRI (2019). También se tomaron muestras referenciales del sustrato para cada tratamiento. Todas las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía-Departamento de Suelos de la UNALM, para los análisis respectivos.

COMPONENTE 3. Innovación en la etapa de fermentación y desarrollo de nuevos productos

Selección de microorganismo

En Perú, la recolección de las diferentes muestras se realizó en la Cooperativa Agroindustrial CP-Cacao Tocache Ltda., ubicada en el Nuevo horizonte, Distrito La Pólvora, provincia Tocache, departamento San Martin. El material de fermentación utilizado correspondió a la línea CCN51. En Colombia, las muestras del material fermentado se obtuvieron en una finca localizada en la Reserva natural La Primavera, ubicada en la vereda La Helena del municipio de Ibagué, en el departamento del Tolima. El material de fermentación utilizado correspondió a la línea ICS60.

Utilizando protocolos que garantizaran la asepsia, se tomaron varias muestras de semillas de cacao CCN51 en fermentación, en bolsas de polietileno con cierre hermético. Las muestras, con aproximadamente 150 g de fermentado, se tomaron a partir de las cajas de fermentación a una profundidad correspondiente a la mitad de su altura. El muestreo se llevó a cabo en tres períodos: a las 24-36, 72 y 144 horas de iniciada la fermentación. Por cada fase se obtuvieron 4 réplicas. En Colombia, los muestreos se hicieron a las 0, 12, 36, 60, 84 y 108 horas de fermentación.

En los laboratorios peruanos, se utilizaron medios selectivos, así: para el caso de las bacterias esporogénicas, medio Triptona-Glucosa-Extracto de carne; para las bacterias ácido-lácticas, medio MRS (Man-Rogosa-Sharpe); en el caso de las levaduras se usó el medio OYG suplementado con oxitetraciclina 0.1%; para el recuento de aerobios mesófilos viables se usó agar PC; para el caso de los anaerobios, agar triptona sulfito neomicina. Por último, los coliformes totales y fecales se Caldo lauril sulfato triptona. Las condiciones de incubación se presentan en la tabla 3. Para el conteo de UFC se utilizaron solo aquellas placas que contuvieron entre 30 y 300 colonias.

Para proceder a la purificación de los aislamientos se utilizaron los mismos medios de cultivo que en la fase de aislamiento. Los aislamientos por purificar y multiplicar se seleccionaron por criterios morfológicos, abarcando la mayor diversidad aparente. Los aislamientos seleccionados se caracterizaron morfológicamente, utilizando métodos estándar (Willey et al., 2008) y molecularmente, por amplificación por PCR y secuenciación del gen ARNr 16S, en el caso de las

bacterias, y del segmento ITS en el caso de las levaduras.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación para la determinación de las poblaciones microbianas a analizar

Análisis	**Medio de cultivo**	**Condiciones de incubación**
Bacterias esporogénicas *(Bacillussp.)*	Agar TGE	28°C por 48 horas
Bacterias ácido lácticas	Agar MRS	35°C por 24 horas
Recuento de Levaduras	Agar OGY*	28°C por 48 horas
Aerobios mesófilos	Agar Plate Count	28°C por 48 horas
Anaerobios	Agar TSN	35°C por 24 horas
Enumeración de coliformes	Caldo Lauril	35°C por 48 horas

*Suplementado con Oxitetraciclina al 0.1%

Previamente, el ADN genómico fue obtenido utilizando el kit Genejet Genomic DNA Purification (Thermo Fisher, UK), en el caso de las muestras peruanas, y el método fenol-cloroformo, en el caso de los laboratorios colombianos. La integridad del ADN genómico se verificó en gel de agarosa y la cuantificación se hizo por espectrofotometría. Los productos PCR purificados fueron secuenciados por la empresa Macrogen Inc. (Seoul, Corea) de acuerdo con las especificaciones de la compañía. Los resultados de las secuencias fueron examinados y editados con el programa de alineamiento de secuencias BioEdit (Hall, 1999). Posteriormente, se identificó las cepas más relacionadas y con mayor porcentaje de similitud de la base de datos del GeneBank utilizando la herramienta BLASTn (*Basic Local Alignment Tool for nucleotides)* de la base de datos pública del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (http//:www.ncbi.nlm.nih.gov). Una vez purificados, los diversos aislamientos se criopreservaron en glicerol al 30% y -80°C.

Desarrollo de protótipo

El fermentador se diseñó y desarrolló en siete etapas propuestas para el proyecto: Obtención del concepto, Revisión de literatura, Diseño de modelos, Selección del modelo, Fabricación del modelo seleccionado, Pruebas de ensayo y Diseño final del prototipo.

1. Obtención del concepto

A través de entrevistas con académicos y profesionales relacionados con el sector cacaotero peruano, se generaron ideas sobre cómo debería ser el fermentador para diseñar, para que se pueda formular el concepto del producto, a partir del cual se obtendría el diseño y se desarrollaría el prototipo.

2. Revisión de literatura

A través de una exhaustiva búsqueda de información sobre los tipos de fermentadores que se han diseñado y construido para granos de cacao, se seleccionó la que podría ser utilizada para el diseño del prototipo teniendo en cuenta el concepto de producto previamente definido.

3. Diseño de modelos

A partir de la información, se inició el proceso de generación de bocetos iniciales del prototipo de fermentador, buscando cumplir gráficamente con el concepto de producto. Se llegó a esbozar la estructura de soporte, el contenedor de la masa de granos de cacao y aspectos funcionales a través de los elementos que cumplirían con tales funciones. Los esbozos se llevan a plano generándose los modelos.

4. Selección del modelo

Se seleccionó el modelo por cumplir mejor el concepto de producto. Para ello se generaron tablas de comparación de las características estructurales y funcionales de los modelos, así como los costes correspondientes. Es un análisis de costo beneficio y de ventajas y desventajas.

5. Fabricación del modelo seleccionado

El modelo seleccionado fue construido de acuerdo con el plano elaborado a partir de ajustes de métrica de sus componentes aplicando estudios de simulación y optimización, así como de la elección de los materiales de construcción por funcionalidad, disponibilidad y coste.

6. Pruebas de ensayo

Se realizaron pruebas preliminares en el laboratorio de poscosecha y control de Calidad de la Universidad del Tolima en Colombia, trabajando con clones de cacao de la región de San Bernardo – corregimiento del municipio de Ibagué. Para lo cual se dispuso de 200 kg de mazorca que se fermentaron en condiciones controladas durante una semana.

De igual forma se hicieron pruebas en la planta piloto de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional agraria La Molina, donde el modelo construido entró en acción con granos de cacao CCN 51 proveniente de la región de San Martín. Se efectuó la determinación de las cinéticas de calentamiento del prototipo bajo condiciones controladas del ambiente. Para ello, el prototipo funcionó dentro de una cámara donde se expuso a la temperatura constante de 28 °C de 8:00 a.m. a 8 p.m. y de 22 °C de 8:00 p.m. a 8:00 a.m., buscando simular condiciones ambientales diurnas y nocturnas, respectivamente. La remoción o volteo de la masa de granos de cacao se realizó después de las 48 horas de fermentación y por cada 24 horas. Se registraron valores de temperatura del interior de la masa de granos de cacao durante el proceso de fermentación.

Las pruebas de campo se realizaron en la región del Cusco, en el distrito de Echarati, provincia de Quillabamba. Se trabajó con agricultores que integran la Asociación de productores agropecuarios Valle de Echarati. Se utilizaron granos de cacao en baba Chuncho del Cusco y mezcla de trinitarios. Se hicieron pruebas con dos modelos de fermentador, el utilizado en las pruebas en planta piloto y otro con métricas mayores; así mismo, se hicieron pruebas en cajones de madera ubicados en las instalaciones de la Asociación. El peso de la masa de granos de cacao en baba para todos los ensayos fue de 50 kg. Se registraron las temperaturas del interior de la masa de granos de cacao durante la fermentación en prototipos y cajones con un medidor de

temperatura digital. La remoción de los granos de cacao se realizó después de las 48 horas de fermentación y por cada 24 horas hasta el término de la misma.

Para las pruebas de campo se aplicó para cada uno de los parámetros de control medidos un Diseño completo al azar para determinar por análisis de varianza (ANOVA) si hay o no diferencias significativas ($P<0.05$) entre tratamientos de un solo factor denominado modelo de fermentador. Así mismo, se aplicó un análisis de comparación de medias LSD si se encontró diferencias significativas. Los parámetros de evaluación fueron: grado de fermentación logrado, temperatura interna de masa de granos, índice de fermentación, índice de grano, pH, acidez, polifenoles, capacidad antioxidante.

7. Diseño final

Considerando los resultados de las pruebas de ensayo, se determinó el modelo final del prototipo de fermentador.

Obtención de extractos de Flavonoides

Se emplearon granos de los clones TSH-505, ICS-1, ICS-95, IS60, e IMC67 y CCN51, las mazorcas de cacao fueron procesadas en el laboratorio de química aplicada de la Universidad de Ibagué, se extrajeron los granos y se les removió manualmente el mucílago, posterior a esto, los granos fueron liofilizados y almacenados a -20 °C hasta el momento de su extracción.

Los granos de cacao previamente liofilizados se trituraron y fueron depositados en recipientes ámbar para ser sometidos a extracción por maceración en frío empleando etanol acuoso (70:30) durante 3 días con agitación diaria, posteriormente, los extractos se filtraron al vació y se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador Heidoph Hei-VAP Advantage acoplado a una bomba de vacío Vacuubrand Pc3001 VARIO pro, utilizando como sistema de enfriamiento agua recirculada por un Rotachill-Heidolph, los extractos acuosos obtenidos fueron almacenados en recipientes de vidrio color ámbar a -20°C y empleados para los encapsulados de secado por aspersión y liofilización.

Obtención de encapsulados por secado por aspersión

El secado por aspersión se realizó en el equipo YM-015 Yuming Instrument Co. Ltd., Shanghai, China. Para esta metodología se empleó extracto del clon CCN51. La cantidad de encapsulante se calculó como %p/p en relación con el peso del extracto de cacao para los dos porcentajes trabajados 8 g y 16 g de maltodextrina y goma arábiga por cada 100 g de extracto concentrado. Los materiales de pared en polvo se dispersaron directamente en el extracto empleando agitación magnética, el líquido obtenido fue atomizado a dos temperaturas (140 y 160 °C) mediante una bomba peristáltica a través de una boquilla de 1 mm de diámetro, los polvos obtenidos fueron almacenados a -20 °C.

Liofilización

Se realizó en el equipo biobase BK-FD18PT, los encapsulantes se dispersaron mediante agitación magnética en los extractos acuosos de los diferentes clones de cacao a dos concentraciones diferentes de cada encapsulante para un total de 4 tratamiento por clon, las emulsiones fueron vertidas en recipientes ámbar de 20 ml y enfriadas a -60 °C, posteriormente fueron dispuestas en las bandejas del equipo para ser secadas con una temperatura de condensador de -80 °C y 10 Pa de presión.

Caracterización fisicoquímica

Esta metodología se explicó en el componente 1. Adicionalmente se realizó Microscopia electrónico de barrido (SEM), por medio de un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO HD 15, con una EHT (Electron High Tension) de 15 kV. Se utilizó el detector de electrones secundarios (en modo de presión variable) para apreciar en detalle la topografía de las muestras con una alta profundidad de campo. Las muestras fueron tratadas con el metalizador Q150 R ES Plus por bombardeo iónico en fase gaseosa en alto vacío (10ˆ-6 mbar) con metal no oxidante (oro). Se realizó el recubrimiento de las muestras con un espesor fino y uniforme.

Componente 4: Transferencia de conocimiento y tecnología

Se realizaron durante el año 2019, dos talleres presenciales en Colombia y Perú. En los años 2020 y 2021, se realizaron dos ciclos de conferencias virtuales para entrega a la comunidad beneficiaria. Se realizaron dos videos, uno de ellos de información general y otro sobre prácticas postcosecha de cacao.

Desde el año 2019 se participaron en diferentes congresos nacionales e internacionales para presentar los avances de la investigación desarrollada en el marco del proyecto.

De igual forma se han sometido 6 artículos a revistas indexadas para difundir los resultados a la comunidad académica a nivel mundial.

Resultados

Componente 1. Zonificación de ambientes y materiales de cacao de calidad diferenciada

El desarrollo, calidad y rendimiento de un cultivo, están determinados mayormente por la interacción de diferentes factores como el clima, los atributos físicos y químicos del suelo y las prácticas de manejo que se implementen durante el proceso productivo (época y densidad de siembra, riego, fertilización, entre otros). La variabilidad espaciotemporal de dichos factores requiere analizar cada sistema productivo como una unidad, caracterizada en términos de manejo y condiciones ambientales específicas. A partir de la definición e identificación de aquellos materiales de calidad diferenciada, es posible caracterizar los sitios de ubicación con base en una definición biofísica en búsqueda de patrones comunes que condicionen el establecimiento para el cultivo. Para ello, es necesario considerar factores tanto edafológicos como climatológicos que nos permitan entender las diversas condiciones medioambientales sobre la cuales es posible un óptimo crecimiento y desarrollo para estos materiales.

Con la caracterización y delimitación espacial de las variables edafoclimáticas bajo la implementación de los Sistemas de Información Geográfica (SIG), es posible extrapolar las condiciones de un cultivo en particular a sitios con ofertas medioambientales homólogas, que, sin ser zonas con características idénticas, si son ampliamente representativas y confiables para obtener patrones similares de desarrollo en el cultivo.

En esta investigación se realizó un sondeo de los materiales más promisorios y con mejores características del cultivo en los departamentos de Huila y Tolima. Una vez seleccionados, se identificaron los suelos y entorno medioambiental asociado a los mismos, con el propósito de poder identificar aquellas zonas edafoclimáticas homólogas en las que muy posiblemente puedan desarrollarse estos materiales con similares resultados.

Localización y Caracterización Biofísica de Sitios de Materiales de Calidad Diferenciada

La localización de los materiales de calidad diferenciada identificados para el departamento del Tolima se encuentra distribuidos de la siguiente manera: *T11-1*, municipio de Planadas (vereda El Silencio); *T12-3*, municipio de Planadas (vereda Coloradas); *T15-2*, municipio de Ataco (vereda San Antonio de Pole); y *T30-1*, municipio de Palocabildo (vereda Pavas). Para el municipio de Huila, los materiales se encuentran situados así: H01, municipio de Campoalegre (vereda Palmar Bajo); H02, municipio de Rivera (vereda Salado); H08-2, municipio de Rivera (vereda Agua Fría); y H09, municipio Campoalegre (vereda Palmar Bajo) (Gráfico 3).

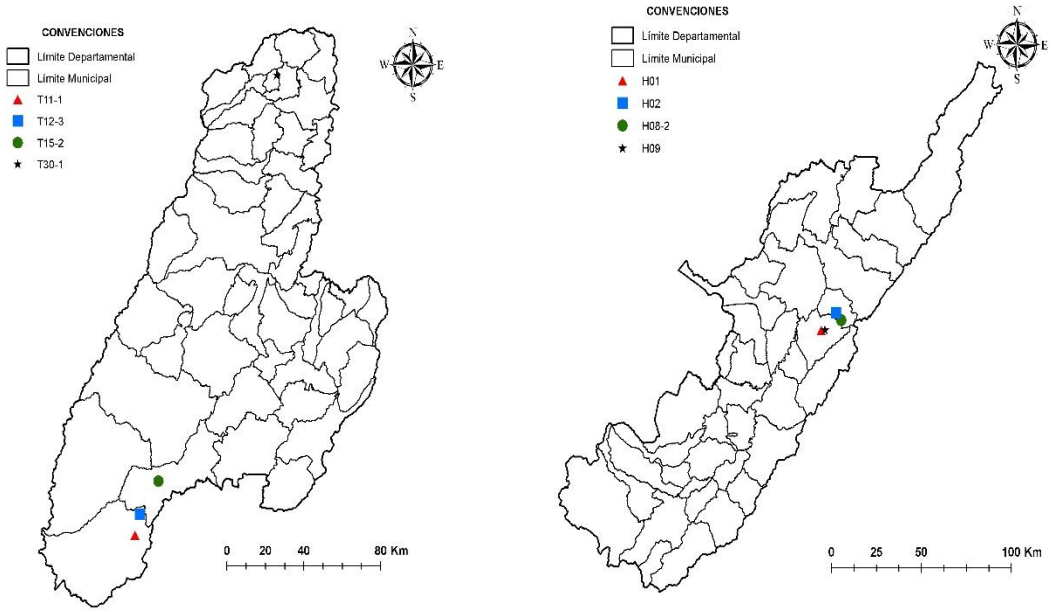


Gráfico 3. Distribución espacial de los materiales de calidad diferenciada identificados para los departamentos de Tolima y Huila

Es necesario aclarar que los valores reportados para las propiedades fisicoquímicas de los suelos de las zonas homólogas identificadas corresponden a una información general reportada en los estudios generales de suelos y zonificación de tierras de los departamentos de Tolima y Huila (IGAC, 2004,2002).

En principio, el impacto de una tecnología dada, y su probabilidad de adopción por parte de productores, debería ser predecible dentro de una región espacialmente definida con similares atributos biofísicos (principalmente propiedades climáticas y edáficas) y socio-económicos tales como: precio de insumos y productos, tamaño de la explotación agrícola, acceso al crédito y los mercados. Como un primer paso hacia el desarrollo de una metodología apropiada, en este estudio se focalizó en los atributos biofísicos que definen la condiciones medioambientales para cultivos de cacao, reconociendo la necesidad de contar con atributos socioeconómicos, especialmente en regiones donde los productores presentan grandes limitaciones al acceso de insumos, maquinarias, crédito, mercados y conocimientos, pero que dadas las condiciones de acceso a información no es posible considerarlas (gráfico 4).

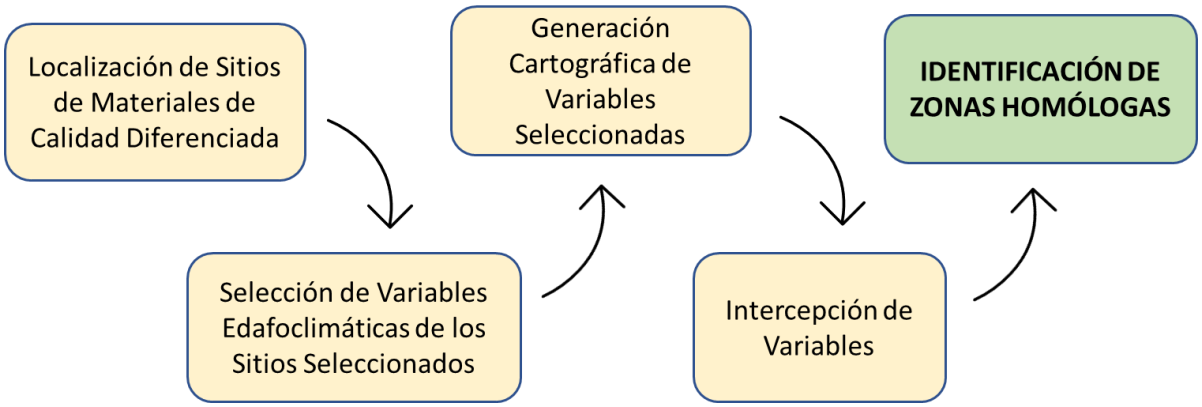


Gráfico 4. Diagrama de flujo metodológico definido para la identificación de zonas homólogas para los cacaos con calidad diferenciada

Identificados los sitios para cada material, se continua con el flujo metodológico definido seleccionado las variables edafoclimatológicas necesarias para caracterizar el cultivo. Para ello, se seleccionaron ocho (8) variables edafológicas las cuales explican no solo el material rocoso predominante si no también su estructura física a la cual el material se adaptó para su desarrollo. Estas variables son: Unidad Cartográfica de Suelo (UCS), Taxonomía, Textura, Régimen de Humedad, Materia Orgánica, Profundidad Efectiva, Pendiente y Drenaje Natural. Estas características físicas de los suelos fueron consideradas a partir del Estudio General de Suelos del Departamento del Tolima a escala 1:100,000 realizado por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC). Dentro de las variables climatológicas seleccionadas tenemos la Precipitación y la Temperatura como principales factores condicionantes (Tabla 4).

Tabla 4. Variables edafoclimáticas seleccionadas para la generación de zonas homologas

Tipos de Variables	Variables
Edafológicas	Unidad Cartográfica de Suelo (UCS)
	Taxonomía
	Textura
	Régimen de Humedad
	Materia Orgánica (%)
	Profundidad Efectiva
	Pendiente (%)
	Drenaje Natural
Climatológicas	Temperatura (°C)
	Precipitación (mm/año)

Zonas Homólogas de Cacaos de Calidad Diferenciada del Departamento del Tolima

En el departamento del Tolima se identificaron los materiales T30-1, T15-2, T12-3 y T11-1, considerados de calidad diferenciada; estos materiales se han originado en áreas con condiciones edáficas y biofísicas especiales. Su distribución geográfica se puede apreciar en el Gráfico .

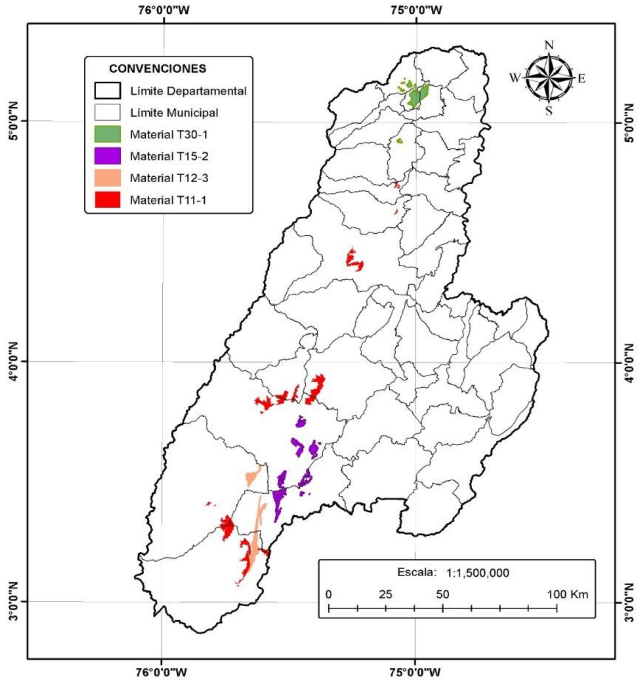


Gráfico 5. Distribución de las zonas homólogas de los lugares donde se identificaron materiales de calidad diferenciada (cultivo de cacao) en el departamento del Tolima.

Para el departamento del Tolima, el material T30-1 presenta condiciones similares sobre los municipios de Falan y Fresno al norte del departamento, por lo que es posible que allí se presenten condiciones únicas para su normal crecimiento y desarrollo. Las zonas homologas para el material T15-2 situado en el municipio de Ataco, se extiende parcialmente sobre este mismo municipio y en pequeños sectores del municipio de Chaparral. Para el material T12-3 situado en el municipio de Planadas, se encontraron zonas con características similares a alas dispuestas sobre los municipios de Ataco y Rioblanco. Por último, el material T11-1 es posible disponer de características aptas para su desarrollo sobre los municipios de Rioblanco, Chaparral, San Antonio y Ortega.

Zonas Homólogas de Cacaos de Calidad Diferenciada del Departamento del Huila

En el departamento del Huila se identificaron los materiales H02, H08-2, H09 y H01, considerados de calidad diferenciada: Al igual que en el departamento del Tolima, estos materiales se han originado en áreas con condiciones edáficas y biofísicas especiales. Su distribución geográfica se

puede apreciar en el Gráfico .

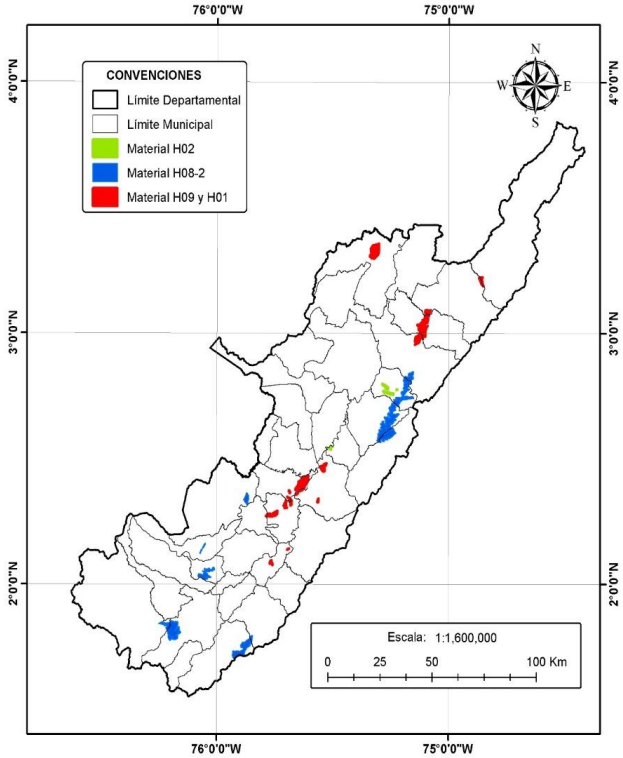


Gráfico 6. Distribución de las zonas homólogas de los lugares donde se identificaron los materiales de calidad diferenciada en el departamento del Huila.

Para el departamento del Huila, el material H02 no presenta grandes zonas de expansión salvo un corto sector ubicado en el municipio de Hobo, pero sin tener mayor representatividad. El material H08-2 es el que más proyección se genera para el departamento con zonas demarcadas sobre los municipios de Acevedo, Pitalito, Oporapa, La Argentina, La Plata, Algeciras, Campoalegre y Neiva. Por último, el material H09 y H01 se proyectan posibles zonas de expansión hacia los municipios de Hobo y Palermo.

Selección y Caracterización de Zonas Homólogas para Perú

El uso actual de los suelos consiste en la destinación asignada al suelo, de conformidad con las actividades que se puedan desarrollar en la misma. Y según los mapas de uso de suelo en las zonas productoras de Cacao, se observa un uso actual de áreas destinadas con fines agrícolas y a una agricultura diversificada, tal como se muestra en el grafico 7.

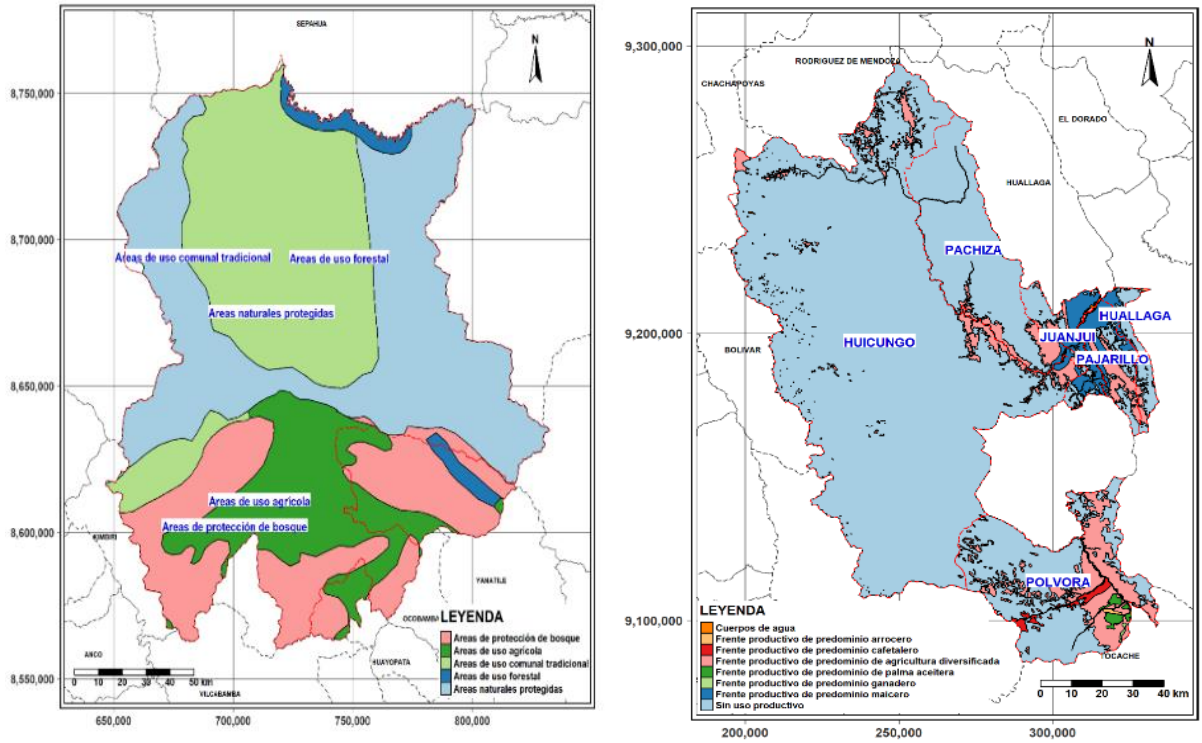


Gráfico *7*. Mapa de Uso Actual de Suelos a) Margen Derecha los distritos de San Martin y Margen izquierda los distritos de Cusco

Capacidad de uso mayor de suelos (cum)

Según la clasificación de suelos elaborada por ONERN en el Perú se representan los suelos mediante una unidad cartográfica amplia: La Asociación de Suelos, utilizando como unidades taxonómicas los Grandes Grupos de Suelos significativos. Para determinar los grupos, clases y subclases de CUM se consideran las siguientes características edáficas y climáticas:

- Edáficas (Suelos): Pendiente, profundidad efectiva, textura, fragmentos gruesos, pedregosidad superficial, drenaje interno, pH, erosión, salinidad, peligro de anegamiento y fertilidad natural superficial.
- Climáticas: Precipitación, temperatura, evapotranspiración, todas influenciadas por la altitud y latitud. Todas ellas son consideradas en las zonas de vida (Holdridge).

Las unidades de CUM de tierra clasificada para una aptitud determinada, debe ser para su uso sostenible, es decir, para una productividad óptima y permanente bajo un sistema de manejo establecido. Ello implica que el uso asignado deberá conducir a la no degradación del suelo, por procesos tales como de erosión, salinización, hidromorfismo u otros.

En las zonas de estudio se tienen tierras que presentan una superficie con buena aptitud agrícola, es decir tierras que presentan las mejores condiciones edáficas y topográficas para la instalación

de cultivos agronómicas de tipo permanente de acuerdo con las condiciones edafológicas y ecológicas de la zona.

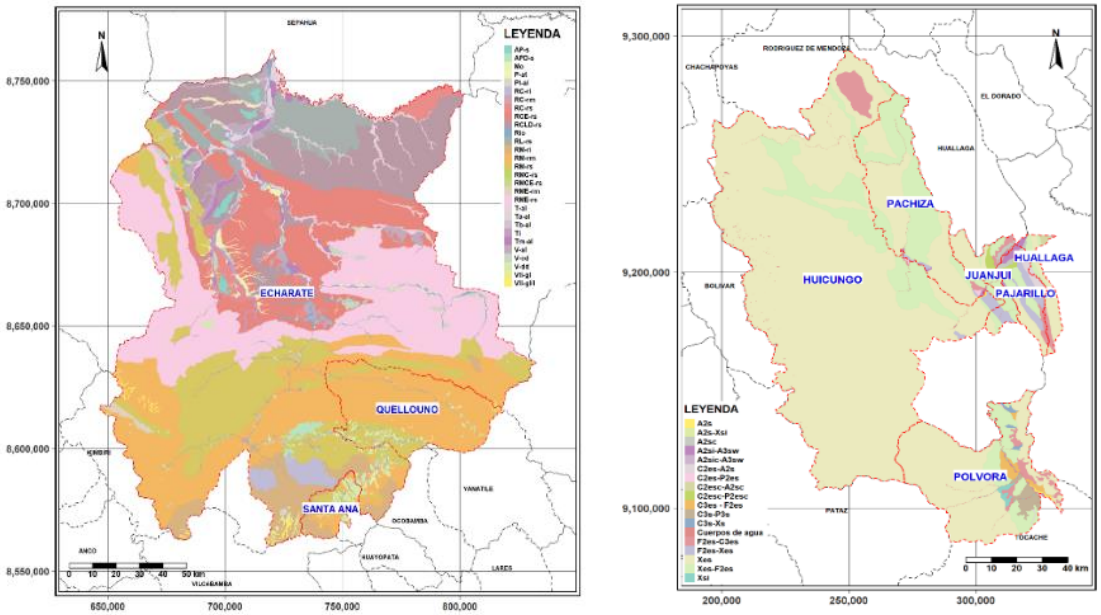


Gráfico 8 Mapa de Capacidad de Uso Mayor a) Margen Derecha los distritos de San Martin y Margen izquierda los distritos de Cusco

Cobertura vegetal

La caracterización de la cobertura terrestre y el uso del suelo de un área, así como sus cambios espacio temporales en relación con las actividades humanas, es fundamental para entender y predecir la dinámica de los componentes del paisaje. Además, proporciona un marco de referencia para el estudio de la sucesión y la dinámica de los ecosistemas, y es una herramienta esencial para el diseño de políticas y estrategias de planificación, conservación y manejo sostenible de los recursos naturales, para lo cual es necesario la producción periódica de la capa nacional a unos intervalos temporales definidos técnicamente, que permitan establecer los cambios sucedidos en los ecosistemas del país.

La delimitación de las coberturas de la capa terrestre corresponde a un importante factor delimitador de zonas con uso potencial distinto al uso agrícola como Territorios Artificiados, Bosques y Áreas Seminaturales, Áreas Húmedas y Superficies de Agua. A partir de lo anterior, se consolidarán núcleos estratégicos para el establecimiento de cultivos como el Cacao Andino en relación con las condiciones agro-climatológicas óptimas.

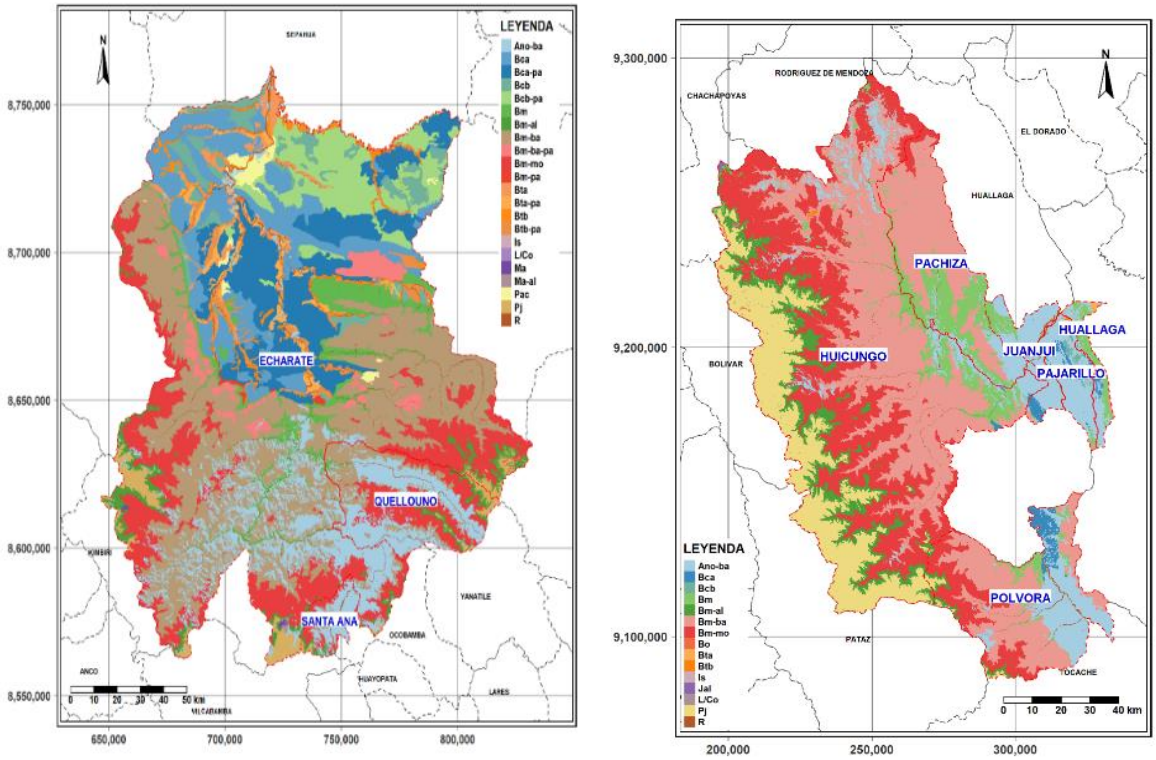


Gráfico *9* Mapa de Cobertura Vegetal a) Margen Derecha los distritos de San Martin y Margen izquierda los distritos de Cusco

El Perú es uno de los países con mayor diversidad de ecosistemas del mundo, los cuales se caracterizan por su gran complejidad vegetal, climática, geomorfológica y edáfica. El Ministerio del Ambiente (MINAM) es el encargado de conducir el proceso de inventario y evaluación del patrimonio natural; y, como tal, ha elaborado el Mapa Nacional de Cobertura Vegetal, el cual constituye una herramienta de gestión de los recursos naturales y de los servicios ecosistémicos en el marco de la política nacional del ambiente. En el grafico 9, se muestra la cobertura vegetal presente en cada una de las zonas en estudio. Según los resultados obtenidos se observa que las zonas productoras de Cacao presentan una cobertura vegetal predominante denominado área de bosque no amazónico y áreas con agricultura.

Materiales de calidad de Colombia

A continuación, se muestran las fotografías a nivel de fruto y semilla de 8 materiales, donde se puede ver la diversidad en su forma especialmente en la rugosidad de cada fruto y al igual las diferentes tonalidades de las semillas.

Ilustración 1. Fotografías de 8 materiales vegetales evaluados de 3 zonas de Colombia – fruto y semilla

Una vez realizada la descripción cualitativa de los materiales se realizaron diferentes pruebas a nivel de fruto, cascara, pulpa y semilla, donde se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$).

A nivel de pulpa se tuvieron diferencias significativas ($P<0.05$), donde a nivel del porcentaje de pulpa se tuvo que la mayoría de las muestras contienen del 2.9 al 7.1%, destacándose los materiales T26-1 y H01 con mayor porcentaje, lo contrario de T30-2 y H08 con menores porcentajes. De igual manera se realizó la medición de pH de la pulpa donde este oscila entre rangos de 2.9 y 4.3 con mayor tendencia en valores de pH de 3.4 a 3.7.

Entre las variables estudiadas de igual manera se encontró diferencias significativas ($P<0.05$) en las características físicas entre algunos de los materiales de acuerdo con la clasificación de los protocolos CATIE (2012), donde el material genético T34-3 tiene el índice de grano más bajo en gran diferencia con el material H08-2. Esta diferencia de igual manera se presenta a nivel de la relación longitud/ diámetro de los frutos entre los materiales F14 y F11 en relación con los materiales F34 y F27.

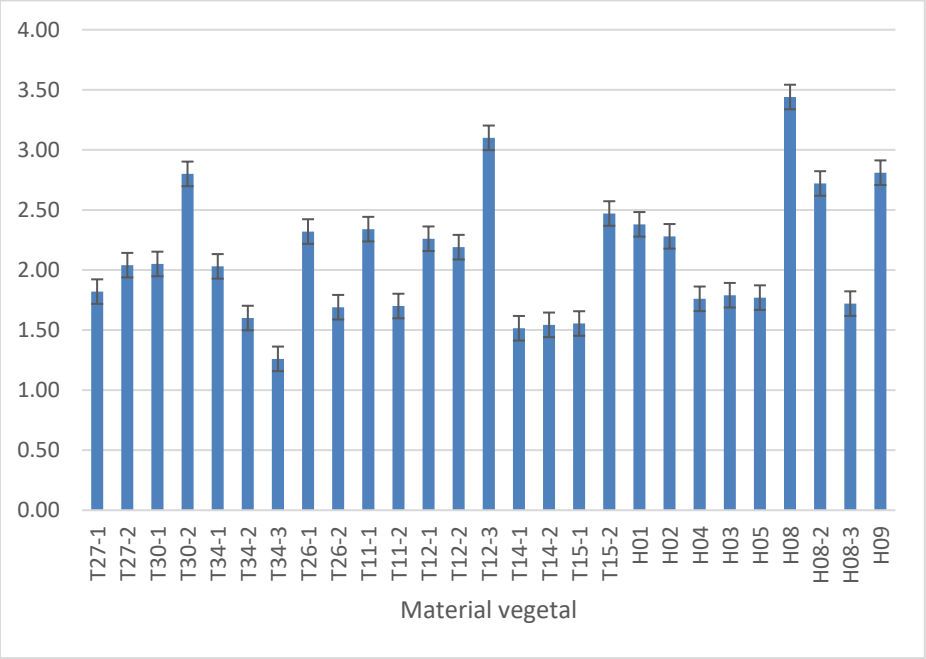


Gráfico 10. Índice de grano de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia

A nivel del contenido de grasa en semilla sin fermentar se encontraron porcentajes que oscilan entre el 31 al 19.80 %, donde se tiene que los materiales T34-1, T11-1 y T12-1 se destacan por su mayor contenido de grasa a diferencia de los materiales T14-2, T15 Y H04. No se encuentran diferencias significativas.

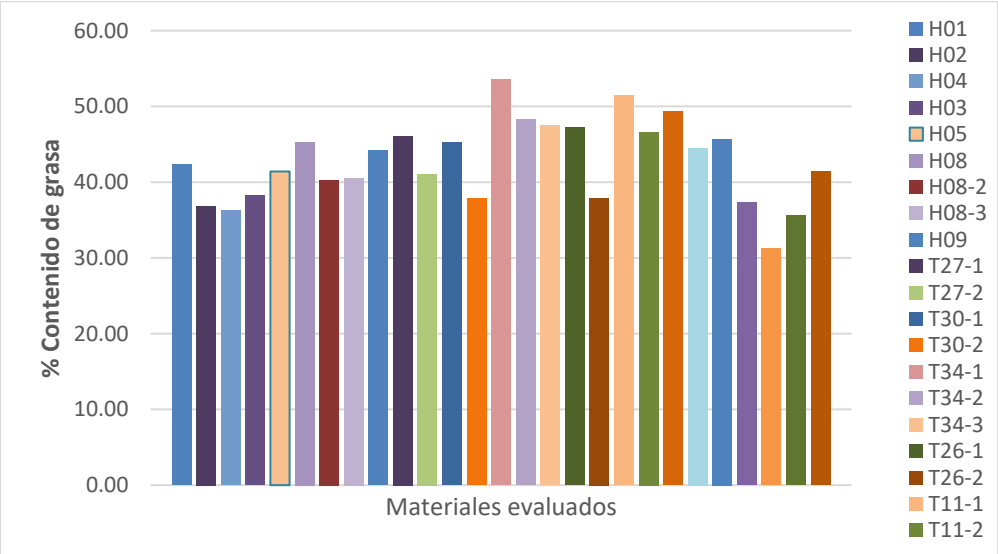


Gráfico 11. Contenido de grasa de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia

Evaluación química

Evaluación de polifenoles totales

En el caso del seguimiento de las pruebas químicas, se puede evidenciar que el contenido de polifenoles totales varía entre el 32.3 mgEAG/g hasta 72 mgEAG/g, dicho contenido se ve en mayores proporciones en los materiales vegetales T14-1 T14-2 y T15-2 con valores entre 64 mgEAG/g a 74 mgEAG/g, del departamento del Tolima a diferencia de H08-2, H08-3 Y H05 con valores menores entre 32.3 y 37.67 mgEAG/g del departamento Huila.

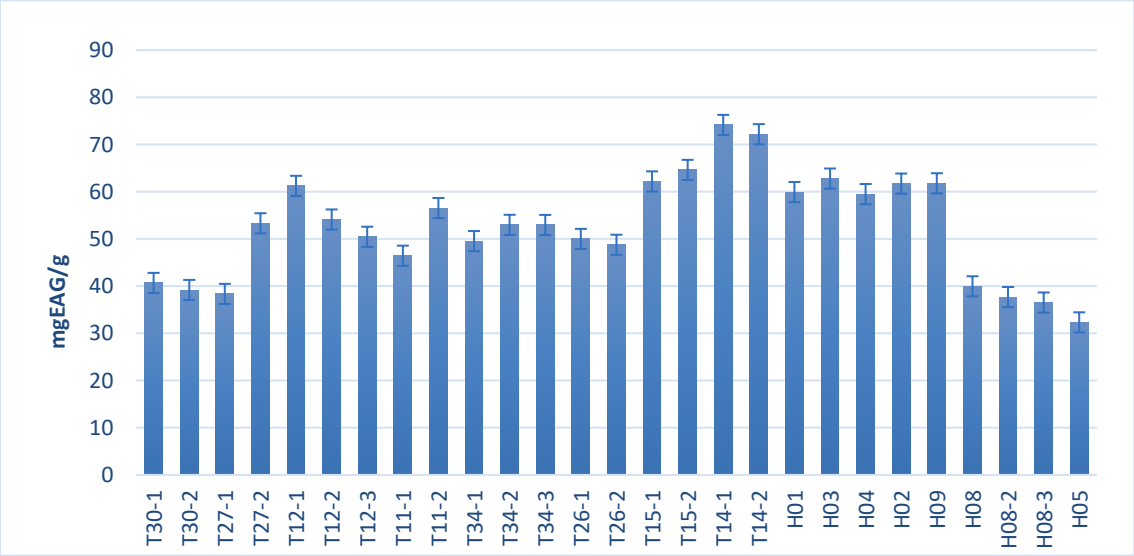


Gráfico 12. Polifenoles totales de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia

- **Evaluación contenida de antioxidantes**

Al igual se realizó el método DPPH. Una vez realizada esta prueba a las semillas de cada uno de los materiales recolectado se encontró que entre los materiales evaluados se tiene diferencia estadística significativa ($P<0.05$), según la comparación de los resultados mediante la prueba de Tukey. El material que contó con mayor contenido antioxidante para este método fue el material T14-1 con un valor de 21.65 µmolET/g, seguido de los materiales T14-2 y T15-1 con valores de 20.90 µmolET/g y 20.64 µmolET/g respectivamente. El material que presento menor contenido fue la muestra T11-1 con un valor de 4.74 µmolET/g.

Los valores de la actividad antioxidante evaluada por el método ORAC variaron entre 6781 y 17581 µmolET/100g en los granos sin fermentar. Los materiales vegetales que presentaron mayor potencial antioxidante por esta metodología fueron H08-3, H08-2 y H01 sin fermentar a diferencia de los clones T11-1 y H03. Se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$), según la comparación de los resultados mediante la prueba de Tukey.

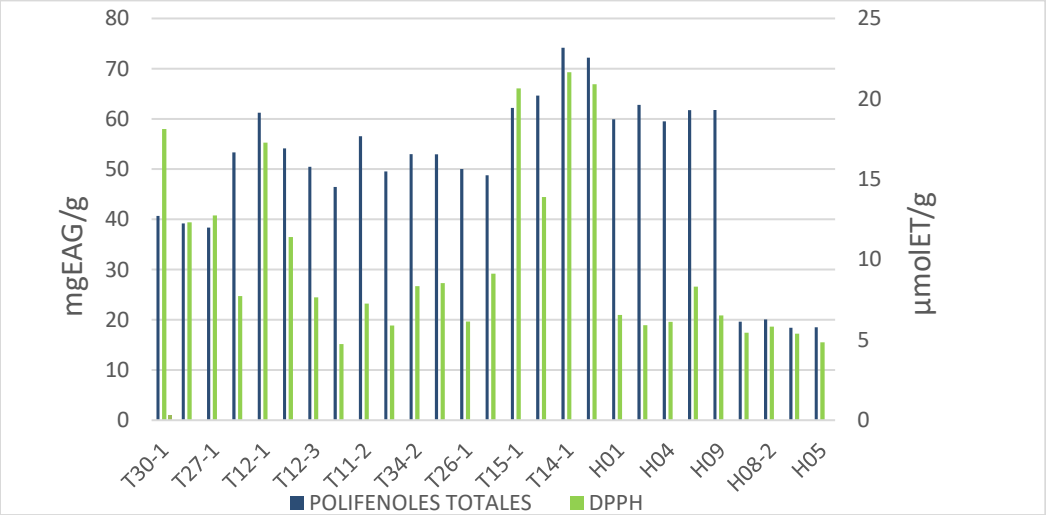


Gráfico 13. Correlación entre Polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH) de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia

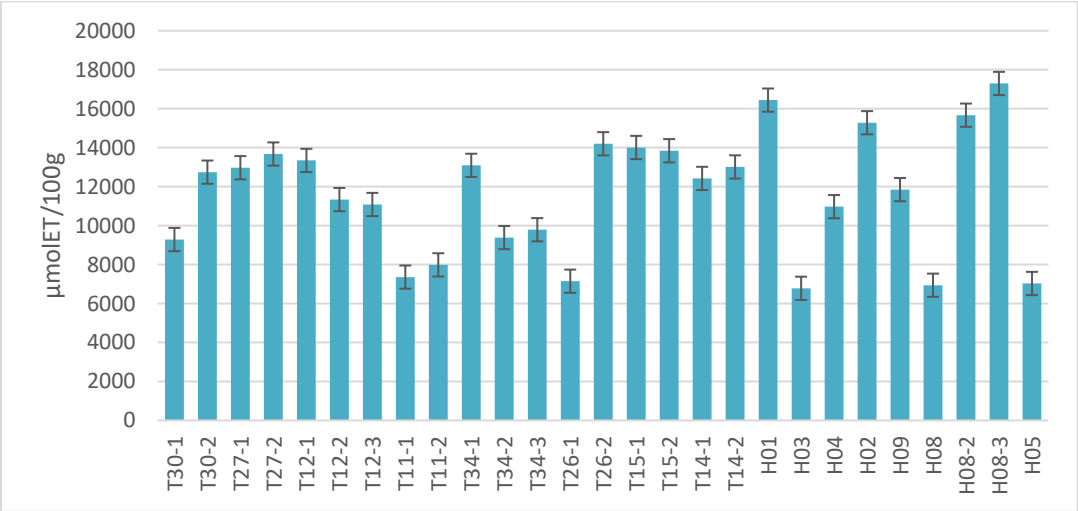


Gráfico 14. Capacidad antioxidante (ORAC) de 27 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia

Evaluación sensorial.

Mediante la caracterización de las pruebas sensoriales se determinó gran presencia de sabores específicos en los materiales evaluados, destacando los materiales T30-1, T15-2, T12-3 y T11-1 a nivel del departamento del Tolima, muchos de estos tuvieron características de notas maderadas (Gráfica 15). Para el departamento del Huila se tuvieron como mejores perfiles los materiales H09, H08-2, H01 Y H02. De igual manera se encontraron atributos deseables como el sabor a cacao, floral, frutal y nuez. Cabe resaltar que ninguno de los materiales registró sabores a moho u olor a jamón ahumado que son problemas de sobre fermentación.

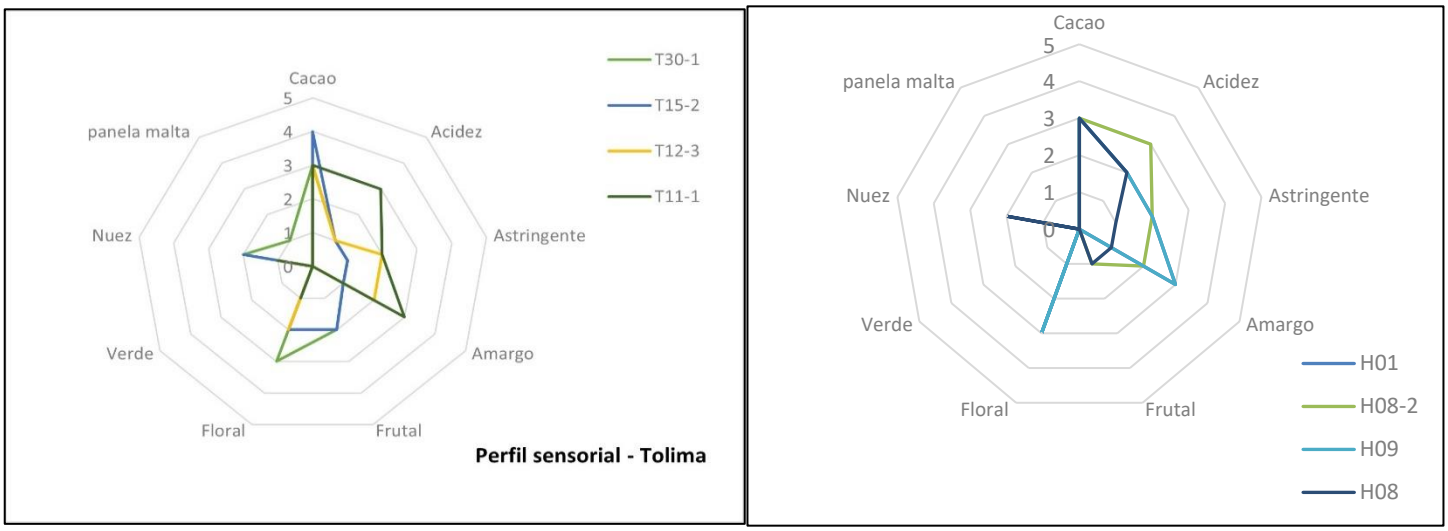


Gráfico 15. Perfil sensorial de 8 materiales vegetales de 3 zonas de Colombia. Lado derecho departamento del Tolima, lado izquierdo departamento del Huila

Materiales de calidad Perú

Se seleccionaron dos árboles de la región Cusco (CC007 y CCWS) y uno de la región San Martín (CFA15) (Ilustración 2 a 5). En la tabla 5 se presentan los datos de caracterización morfoagronómica de los árboles seleccionados.

Tabla 5. Resultados de la caracterización morfoagronómica de árboles seleccionados

Característica	CC007	CCWS	CFA 15
Perímetro	1.25	96	48
Longitud hoja	39.6	36.9	37.5
Ancho hoja	13.2	12.4	12.1
Forma del fruto	Angoleta	Amelonado	Amelonado
Color del fruto inmaduro	Verde intermedio	Verde intenso	Verde intermedio
Forma del ápice del fruto	Atenuado	Obtuso	Obtuso
Rugosidad	Semirrugoso	Rugoso	Liso
Longitud del fruto	26.3	18.6	19.1
Perímetro del fruto	30.6	29.3	31.1
Grosor de la cáscara	1.5	1.3	1.4
Peso del fruto	766.6	526	548.2
Peso fresco semillas	201.5	162	149.6
Número semillas	56	41	40
Forma semillas	Oblongo	Oblongo	Oblongo
Color semillas	Violeta	Violeta	Violeta
Índice de grano	1.2	1.76	1.52

En cuanto al índice de mazorca, se observa que los árboles tipo Chuncho presentaron valores similares de 13.5 (CCWS) y 13 (CC007), mientras que el árbol de San Martín presentó índice de mazorca más alto de 17.6, este índice es importante porque influye en el rendimiento final y está relacionado con el número de semillas por fruto y el tamaño del grano, siendo inversamente proporcional al rendimiento (Cilas, Machado & Motamayor, 2010).

Con respecto a características como forma del fruto se encontró que CC007 presenta forma angoleta y es un fruto de tamaño más grande que el promedio de los frutos del cacao tipo Chuncho, mientras que los frutos de los árboles CCWS y CFA15 presentaron frutos con forma amelonada. Los tres árboles presentan frutas de color verde cuando están inmaduras y en la madurez amarillo. En cuanto a la rugosidad, los frutos del árbol CCWS son los más rugosos mientras que en el árbol CC007 son semirrugosos y en el árbol CFA con los surcos lisos que es característico de la forma amelonada. En general se puede decir que el fruto del árbol CC007 es el más grande de los tres. Se debe continuar con la evaluación en experimentos en campo de los tres árboles seleccionados dentro de pruebas agronómicas para evaluar la expresión de sus características de rendimiento.

Ilustración 2. Imágenes del árbol CC007 de la región Cusco.

Ilustración 3. Imágenes del árbol CCWS de la región Cusco.

Ilustración 4. Imágenes del árbol CFA 15 de la región San Martín.

Análisis químicos

Con respecto a los resultados de evaluación de las características químicas de los granos de los árboles seleccionados, en la tabla 6 se presentan los contenidos de proteína, carbohidratos, grasa, fibra, humedad y calorías de los tres árboles.

Tabla 6. Resultados de caracterización química de frutos de árboles seleccionados.

Variables		**CFA15**	**CCWS**	**CC007**
Grasa	g/100 g de muestra	36.7	47.8	40.2
Proteína	g/100 g de muestra	15.7	14.7	16.0
Fibra cruda	g/100 g de muestra	24.7	24.6	22.4
Carbohidratos	g/100 g de muestra	43.7	33.6	163.7
Cenizas	g/100 g de muestra	3.9	3.9	4.1
Humedad	g/100 g de muestra	7.8	6.2	7.5
Calorías de grasa	%Kcal	58.1	69	62.0
Calorías de proteínas	%Kcal	11.1	9.4	11.0
Calorías de carbohidratos	%Kcal	30.8	21.6	27.1
Energía total	%Kcal/	523.4	584.4	441.3

Contenido de polifenoles y actividad antioxidante

Se evaluó el contenido de compuestos funcionales en los árboles seleccionados como los polifenoles y la actividad antioxidante. Los resultados se presentan en la tabla 7. Se observa que el árbol CFA15 presentó el valor más alto en el contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante, mientras que los árboles de Cusco presentaron valores más bajos. Los valores de los fenoles totales son superiores a los reportados por Rojas et al. (2017) para varios tipos de cacao Chuncho donde el rango descrito fue de 3.0 a 1.4 mg EAG/g y en el rango de los

resultados reportados por Ordoñez et al. (2020) en varios tipos de cacao Chuncho y el genotipo SHU 1 que presentaron valores entre 18.6 y 6.4 mg EAG/g. Según Terán & Morán (2021), la cantidad y proporción de los polifenoles puede variar por factores genéticos, ambientales y agronómicos, sin embargo, se puede considerar que el cacao es una buena fuente de antioxidantes comparado con otros productos reconocidos como por ejemplo el vino tinto.

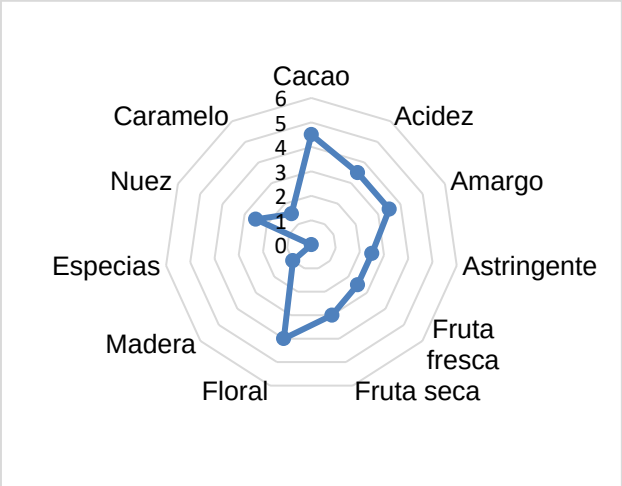
Tabla 7. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de los árboles seleccionados

Variables	**CFA 15**	**CC007**	**CCWS**
Capacidad Antioxidante (µM Trolox/ g)	17581.7	4359.7	709.1
Compuestos fenólicos (mg EAG/100 g)	9.9	6.6	5.7

Análisis sensorial

La evaluación sensorial de las muestras de estos árboles demostró su potencial de calidad organoléptica que corrobora la expresión en atributos típicos del cacao Chuncho que es considerado fino de aroma por tener características individuales distintivas con sabores florales, nueces, especias y frutales, con menor amargor y astringencia (Condori et al., 2014, Quispe 2019).

El árbol CFA 15 seleccionado en la región San Martín presentó notas de cítricos y frutas secas, herbales y floral de flores de violeta, madera y caramelo con lo que también se puede destacar con potencial como cacao fino que puede hacer parte de la población segregante de la semilla híbrida que fue entregada dentro de programas de mejoramiento a en los años 60 (Perea et al., 2013).

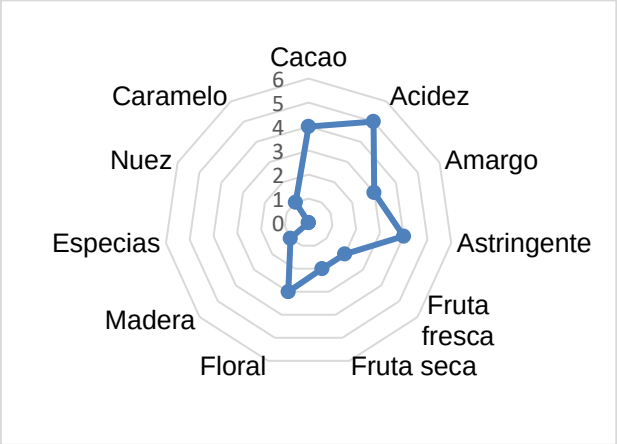


Olor ácido y nuez, atributos básicos en balance, notas de frutas frescas de carne blanca y ciruelas, fruta seca en baja intensidad. Resaltan notas florales de jazmín y herbales que persisten hasta el final, complejo, balanceado, final chocolatoso.

Gráfico 16. Evaluación sensorial frutos árbol CC007

Acidez inicial brillante, notas de frutos rojos, frutas secas, y floral suave pero persistente, astringencia aterciopelada y final de nuez como marañón.

Gráfico 17. Evaluación sensorial frutos árbol CCWS



Acidez que resalta al inicio, suave intensidad de frutas frescas como cítricos, notas herbales y florales de violeta de baja intensidad, baja intensidad de madera y caramelo al final.

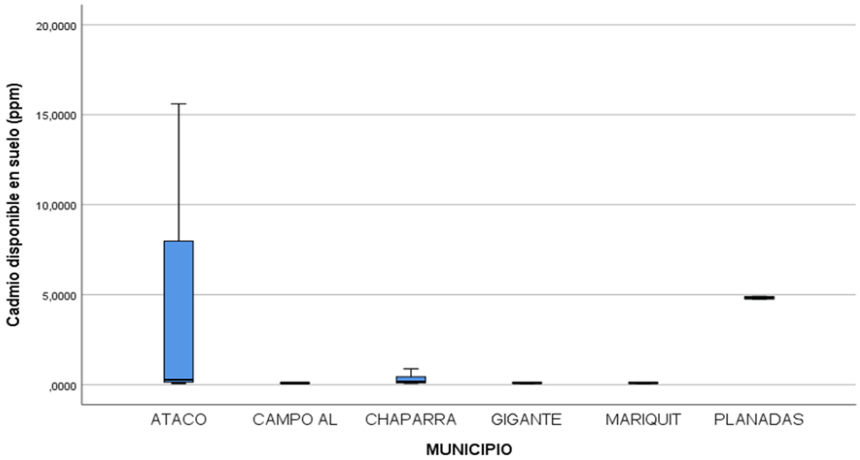
Gráfico 18. Evaluación sensorial frutos del árbol CFA15

Componente 2. Manejo agronómico

Colombia

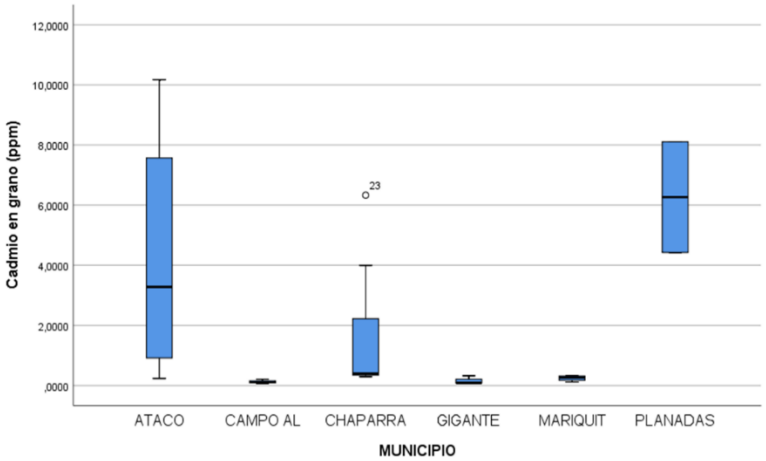
Para el caso de Colombia los contenidos de cadmio en los granos de cacao presentaron un rango muy amplio de valores, entre 0.028 y 10.17 mg/kg, siendo los municipios del sur del departamento de Tolima que presentaron los frutos con mayores concentraciones (Gráfico 19).

Los granos de los frutos recolectados en Chaparral, Ataco y Planadas presentaron contenidos promedio de 1.57, 4.24 y 6.26 mg kg-1, respectivamente, niveles muy superiores a los permitidos por la reglamentación internacional. Los granos de cacao de los frutos de las plantas recolectadas en Mariquita, Gigante y Campo Alegre tuvieron contenidos de cadmio promedios de 0.24, 0.14 y 0.13 mg kg-1 (Gráfica 20), respectivamente.



Gráfica 19. Contenido de cadmio disponible en el suelo para varios puntos de muestreo en diferentes municipios del departamento del Huila y Tolima en Colombia.

La relación entre los contenidos de cadmio total en los tejidos vegetales y el cadmio disponible en el suelo se denomina factor de bioacumulación, el cual es un indicativo de la preferencia de una especie por un ion particular. En el presente estudio, el factor de trasferencia varió entre 0.44 y 24.35, con una media de 3.93, la cual es muy superior para el factor de transferencia registrado para otros cultivos (grano de trigo = 0.055, tubérculo de papa = 0.19, zanahoria = 0.08, etc.) (Smolders, 2001), lo que podría indicar una mayor aptitud del cacao para absorber el cadmio, en relación con otros cultivos.



Gráfica 20. Contenido de cadmio en granos de cacao de diferentes municipios del departamento del Huila y Tolima en Colombia.

Perú

La gráfica 21 y 22 se presentan los descriptivos correspondientes a los contenidos de cadmio extraíble en suelo y contenidos de cadmio en grano de cacao para todas las muestras analizadas.

Como es evidente, en ningún caso, las muestras de granos de cacao presentaron valores iguales o superiores a los establecidos en la normativa internacional como limitantes para su mercadeo, lo cual se explica en que los niveles de cadmio extraíbles en el suelo tampoco fueron significativos, en ninguno de los suelos de las regiones muestreadas. En Cusco, los niveles máximos de cadmio disponible en el suelo alcanzaron 0.24 mg kg^{-1}, siendo este valor el más alto para las tres regiones evaluadas, sin embargo, los promedios más altos de contenido de cadmio en grano lo presentaron los suelos de Tocache y Mariscal Cáceres, con 0.58 y 0.44 mg kg^{-1}.

Se concluye así que, en el caso de los lotes muestreados en Perú, ninguno presentó problemas de cadmio que afecten la calidad de los frutos de cacao.

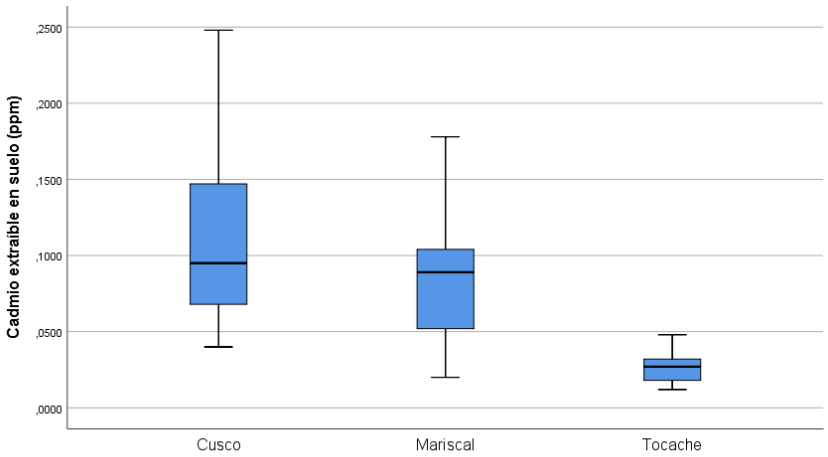


Gráfico 21. Contenido de cadmio disponible en el suelo para varios puntos de muestreo en diferentes localidades productoras de cacao en Perú.
Fuente: Autores

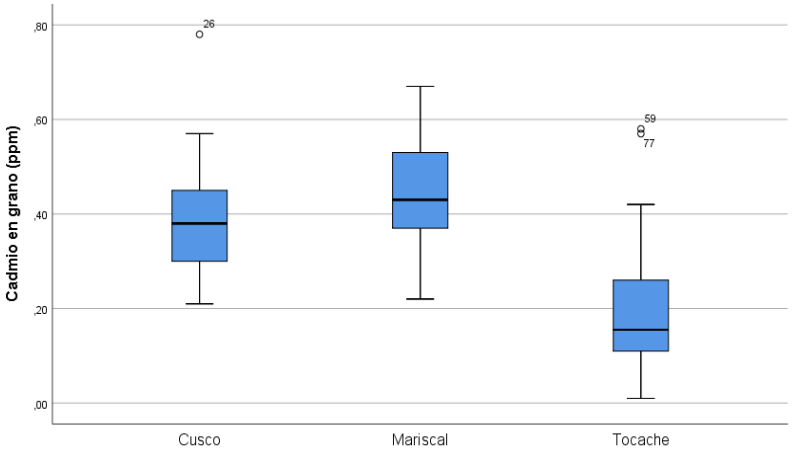


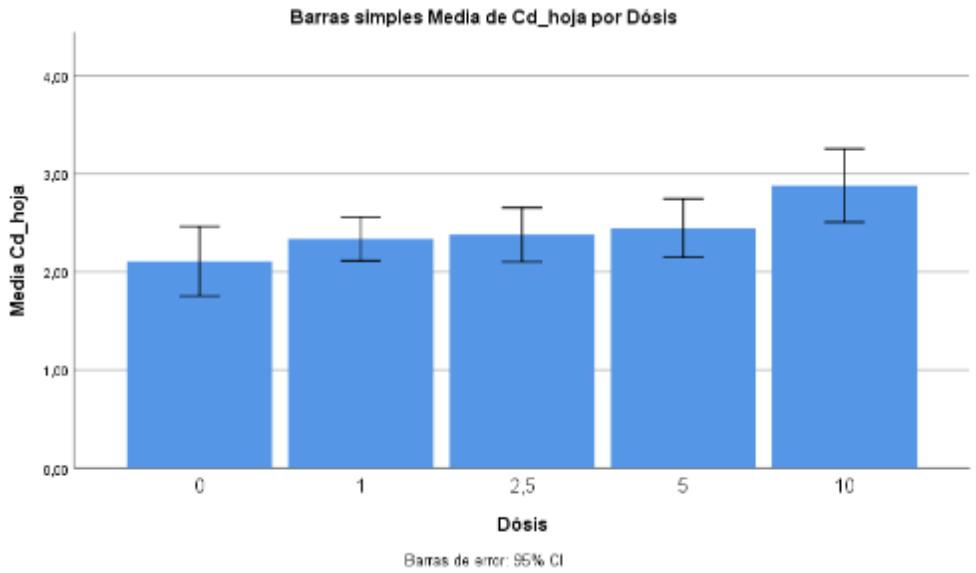
Gráfico 22. Contenido de cadmio en grano de cacao para diferentes localidades productoras de Perú.

Efecto de los tratamientos sobre el contenido de cadmio foliar

En lo que corresponde al contenido foliar de cadmio, los tratamientos produjeron efectos estadísticamente diferentes. De una parte, la dosis de cadmio aplicada al sustrato produjo medias estadísticamente diferentes ($P < 0,03$) sobre los contenidos de cadmio en los tejidos foliares, atendiendo una relación directa: a mayor concentración de cadmio en el sustrato, mayor contenido de cadmio foliar (gráfico 22).

Los tratamientos aplicados como enmiendas al sustrato (SN: suelo sin enmienda; Mic: inoculación con hongos micorrícicos; MgO: adición de óxido de magnesio; Cdol: adición de cal dolomita; Cagr: adición de cal agrícola.) produjeron, también, diferencias estadísticas significativas ($P < 0,01$) en cuanto a su efecto en la acumulación de cadmio foliar.

De otra parte, la aplicación de hongos micorrícicos solos o en combinación con cal dolomita (1,5 t/ha) redujo los niveles de cadmio foliar hasta valores estadísticamente equivalentes a los obtenidos en el caso de los tratamientos testigo sin cadmio y sin aplicación de enmiendas, mientras, la aplicación de cal dolomita o cal agrícola solas, o de sulfato de magnesio solo, produjeron las mayores acumulaciones de cadmio en los tejidos foliares de las plantas (gráfica 23).



Gráfica 23. Efecto de la aplicación de diferentes niveles de cadmio al sustrato de siembra sobre los contenidos de cadmio foliar en plántulas de cacao de seis meses de edad.

Las estrategias para reducir la absorción de cadmio por las plantas de cacao se pueden clasificar en aquellas que se basan en utilizar materiales vegetales con menores tasas de absorción del elemento, debido a diferentes mecanismos fisiológicos dependientes del genotipo, y aquellas que

se enfocan en disminuir la biodisponibilidad del cadmio en el suelo, haciéndolo inaccesible para su toma por parte de las raíces de las plantas. Los tratamientos aplicados en el presente ensayo se incluyen en esta última categoría.

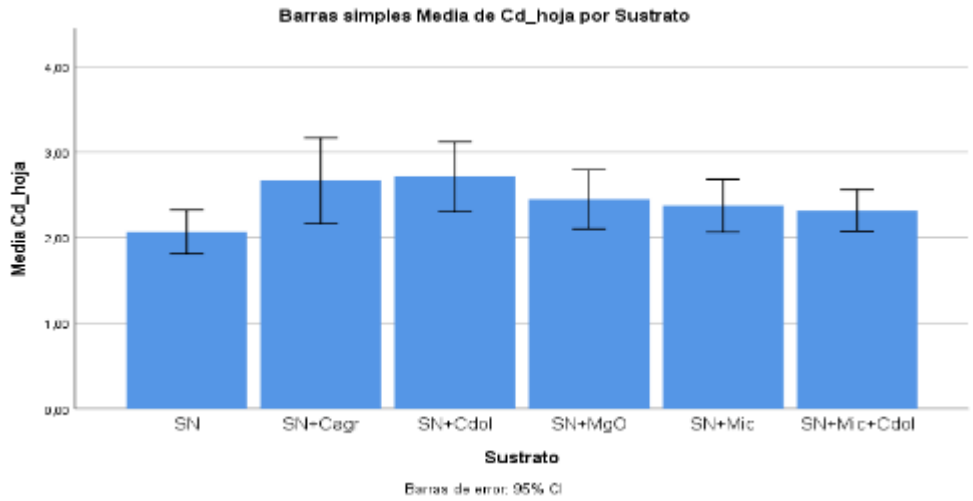


Gráfico 24. Efecto de la aplicación de diferentes tipos de enmiendas al sustrato de siembra sobre los contenidos de cadmio foliar en plántulas de cacao de seis meses de edad.

Efecto de las dosis crecientes de cadmio en la concentración de este elemento en el tejido vegetal de cinco genotipos de cacao

En la Tabla 8 se presenta el contenido de cadmio en las hojas y raíces de plantas de los cinco genotipos de cacao estudiados, a 165 días después de su aplicación. Se encontró que la alta concentración de cadmio contribuyó a su alta acumulación en la planta y la absorción fue mayor, conforme la dosis se incrementó. Como señalan Grant et al. (1998) la cantidad de cadmio acumulada y traslocada en las plantas varía con las especies y con los cultivares, dentro de las especies.

En los cinco genotipos de cacao, hubo una tasa creciente de acumulación de cadmio, tanto en hojas como en raíces. Pero la mayor acumulación ocurrió en las raíces, con una menor traslocación hacia las partes aéreas de la planta, en este caso las hojas, tal como lo informaron Stritsis & Claassen (2013). Argüello et al. (2019), también encontró que cuando se añade más cadmio al sustrato, mayor es el contenido de este elemento en la planta (Argüello et al., 2019); Cuando se analizó el contenido de cadmio en las hojas entre los genotipos; en el CCN-51 se reportó los niveles más altos y varió desde 0.01 hasta 5.32 mg de cadmio/100 g de materia seca (ms), para el testigo y el tratamiento con la dosis más alta de cadmio (150 ppm), respectivamente. El menor contenido correspondió al POUND-7, en la que se registró valores de 0.02, 1.56, 2.17 y 3.56 mg de cadmio/100 g de ms para las dosis de 0, 50, 100 y 150 ppm de cadmio, respectivamente (Tabla 8). El contenido en las raíces fue mayor comparado con las hojas, pero

también varía, según el genotipo. En el CCN-51 se reportó los niveles más bajos y varió desde 0.04 hasta 12.46 mg de cadmio/100 g de materia seca (ms), para el testigo y el tratamiento con la dosis más alta de cadmio (150 ppm), respectivamente.

Tabla 8. Contenido promedio de cadmio en hojas y raíces de cinco genotipos de cacao en respuesta a la aplicación de dosis crecientes de cadmio en un sustrato en condiciones de Vivero en San Ramon/Chanchamayo-Junin

Genotipo	Variables evaluadas	Dosis de cadmio ppm			
		0	50	100	150
CCN-51	Hojas	0.01	3.86	4.55	5.32
	Raíces	0.04	7.87	9.94	12.46
	Hojas + Raíces	0.05	11.75	14.49	17.78
ICS-60	Hojas	0.04	2.33	3.43	4.10
	Raíces	0.06	9.94	10.49	20.60
	Hojas + Raíces	0.60	12.27	13.92	24.70
ICS-95	Hojas	0.02	2.20	3.45	4.26
	Raíces	0.02	6.28	17.59	20.20
	Hojas + Raíces	0.04	8.48	21.04	24.45
POUND-7	Hojas	0.02	1.56	2.17	3.56
	Raíces	0.04	4.56	17.61	32.15
	Hojas + Raíces	0.06	6.12	19.77	35.70
VRAE-99	Hojas	0.02	2.23	3.23	3.47
	Raíces	0.02	5.34	11.92	16.56
	Hojas + Raíces	0.04	7.56	15.15	20.04

COMPONENTE 3. Innovación en la etapa de fermentación y desarrollo de nuevos productos

Cuantificación de poblaciones microbianas

Se realizó la cuantificación de las poblaciones microbianas presentes en los fermentos muestreados en los diferentes tiempos (Gráfico 25). De acuerdo con los resultados, el nivel poblacional de levaduras en las muestras T1 se encontraba en 10^7 UFC.mL^{-1}, observándose que dicho valor va disminuyendo a medida que se da la fermentación hasta valores alrededor de los 10^2 UFC.mL^{-1} casi al final del proceso. La fermentación se inicia con la conversión de los azúcares presentes en la pulpa que cubre el grano de cacao a monómeros tales como glucosa y fructosa, los cuales son transformados a etanol bajo condiciones de anaerobiosis. Dicha transformación se da principalmente por acción de las levaduras en las primeras horas del proceso.

En cuanto a las poblaciones bacterianas estudiadas, exceptuando al grupo de las bacterias esporogénicas, estas se encontraron en alrededor de 10^8 UFC.g^{-1} en las muestras de la T1. Tanto el nivel población de aerobios como de anaerobios mostraron un declive a medida que se da la fermentación, siendo más marcado en la población de microorganismos anaerobios en el tiempo. La fermentación del cacao se inicia con una fase anaeróbica en la cual se promueve la conversión de los azúcares presente en la pulpa a etanol. A medida que se da esta conversión, los cambios

fisicoquímicos que se producen en el sistema, así como la aplicación de aeración mediante mezclas mecánicas esporádicas de los granos dentro de la caja de fermentación, generan las condiciones de un sistema aerobio, promoviendo la sucesión bacteriana, proceso necesario para que la conversión de los diferentes compuestos presentes en la pulpa continúe.

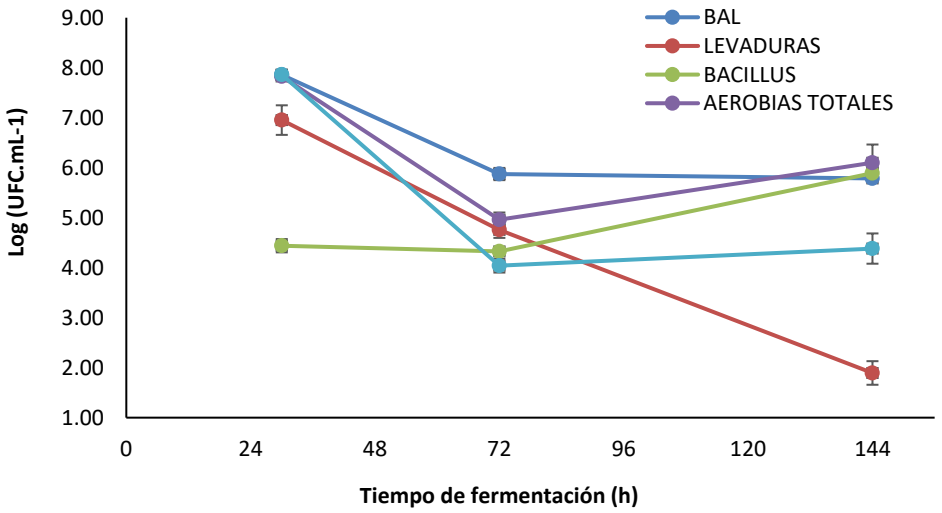


Gráfico 25. Dinámica poblacional microbiana del proceso de fermentación espontanea de granos de cacao.

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) presentaron sus mayores valores poblacionales en las primeras horas del proceso de fermentación (10^7 UFC.mL^{-1}). Se ha reportado que el pico poblacional de las BAL se da durante la T1, esto es debido a que el entorno cambia a un sistema de microaerobiosis por efectos del consumo de azúcares y aumento del pH y temperatura producto del metabolismo de las levaduras, promoviendo así el crecimiento de las BAL. Sin embargo, ciertas especies de BAL pueden estar presentes junto con las levaduras desde etapas muy tempranas de la fermentación, principalmente aquellas del género *Lactobacillus* (Schwan & Wheals, 2004). Posteriormente, se observó un descenso en las siguientes 48 h, hasta valores alrededor de 10^6 UFC.mL^{-1}, manteniéndose dicho nivel hasta los 5 días. Esta La disminución del nivel poblacional está atribuido principalmente a los cambios que se dan en el sistema debido a la alta presencia de etanol y el incremento de la temperatura (De Vuyst & Weckx, 2016), así como al aumento de la presencia de oxígeno en el sistema (Passos *et al.,* 1984).

Por otro lado, el nivel poblacional de las bacterias esporogénicas fue detectado en las tres fases de fermentación evaluados. En el presente estudio se observó que el mayor pico poblacional se dio en la última fase de fermentación, con un nivel poblacional de 10^6 UFC.mL^{-1}, así también durante este periodo la temperatura del sistema fue la más elevada (alrededor de las 47 °C) en contraste a la inicial (31°C). Las bacterias del género *Bacillus* pueden estar presentes en todas las fases de la fermentación, sin embargo su crecimiento se manifiesta a partir de las 72 h (Sarbu &

Csutak, 2019). Factores como el aumento de temperatura y pH hacen que las bacterias de este género se reproduzcan tardíamente. Estos cambios en las condiciones fisicoquímicas del sistema de fermentación pudieron haber favorecido la proliferación de este género bacteriano.

Desarrollo del Prototipo de fermentación ecológico

En la ilustración 5 se presenta el modelo 4 construido en Colombia, en el cual se realizaron dos ensayos a escala con o sin adición de inóculo. La capacidad del equipo es de 60 kg, presentándose dificultades en la homogeneidad de la mezcla en la base del recipiente de plástico. Sin embargo, se logró un buen control de la temperatura como se observa en el gráfico 23, presentándose mayor temperatura en la parte superior del equipo y menor en la parte inferior. Lamentablemente no se alcanzó la temperatura de 45°C aun después de 7 días de fermentación.

Al realizar la prueba de corte el porcentaje de cacao bien fermentado no fue superior al 55%. Se encuentra todavía un alto porcentaje de granos morados sin fermentar, que alteran la calidad sensorial. Al realizar la evaluación sensorial se determinó un aroma cacao fuerte, sin astringencia, pero con algunas notas verdes, definidos por los granos sin fermentar.

Ilustración 5. Modelo 4 construido en Colombia

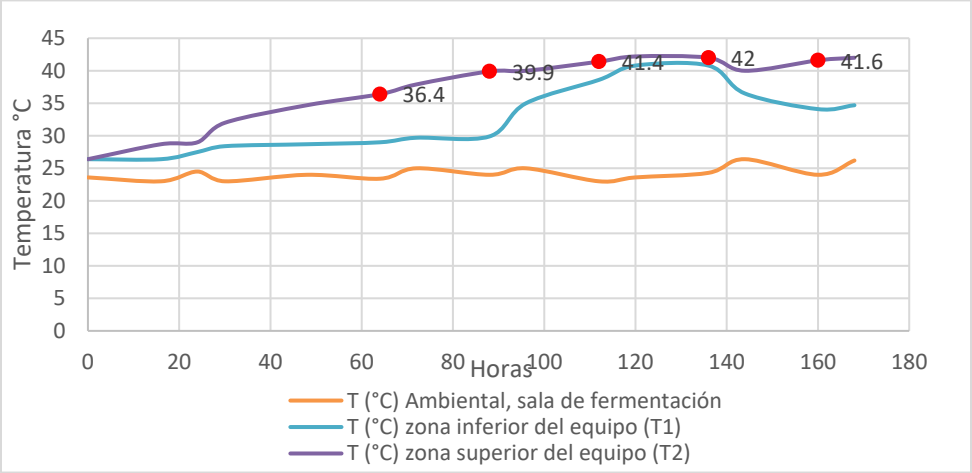


Gráfico 26. Registro de temperatura en modelo 4, pruebas preliminares en Colombia

Pruebas de ensayo- Perú

Operatividad del prototipo en campo

En la tabla 9, se presentan los datos de temperatura de la masa de granos de cacao Chuncho del Cusco obtenidos en el PFP-M5 de tres y cuatro tubos, con los que se buscó conocer la respuesta de los prototipos operativamente en condiciones de campo, teniendo dicho comportamiento expresado en la cinética térmica de la masa de granos. La comparación estadística entre los prototipos PFP-M5-4 y las cajas de fermentación, aplicando el Diseño Completo al Azar, da como resultado que no existen diferencias significativas ($P<0.05$) entre las temperaturas alcanzadas a las 72 y 96 horas. No se compararon las temperaturas del PFP-M5-3 con los demás tratamientos al no tener una réplica más debido a que se tuvo un solo equipo de tres tubos. En la ilustración 6 y 7 se presentan escenas del proceso de fermentación en campo. La temperatura del ambiente en la zona estuvo en el rango de 17 a 30 °C, con una temperatura promedio de 21 °C.

Tabla 9. Comportamiento térmico en campo, índice de fermentación (IF) e índice de grano de cacao Chuncho en grano en la fermentado en los PFP-M5 y caja fermentadora.

Tiempo	**TEMPERATURA (°C)**				
(h)	PFP-M5-3	PFP-M5-4	PFP-M5-4	Caja 1	Caja 2
0	24.4	24.4	24.4	24.4	24.4
24	28.3	26.6	29.3	35.9	34.5
48	27.4	26.3	28.4	37	34.7
72	26.3	41.2	28	39.1	45.5
96	24.5	33.3	27.2	43.4	48.3
120	33	33	33	43.3	48.4
144	34.3	33	30	44.9	48.1
IF (%)	48	62	56	98	42
IG (g/grano)	1.01	0.93	0.98	1.0	0.93

Schubert et al. (2021) indican que, en el proceso fermentativo del Chuncho, se debe cuidar que la temperatura en cajones en la etapa de aerobiosis no sea mayor a 50 °C para que no se cocine el grano, ni menor de 40° C porque los granos se quedarán violeta debido a que no se habrán fermentado. Los valores de índice de fermentación alcanzados (tabla 13) en los dos equipos PFP-M5-4 (62 y 56 %) son menores al de la caja 1 (98 %) pero mayores al de la caja 2 (42 %) y próximo al del PFP-M5-3 (48 %).

Comparando el valor obtenido para la caja cuadrada (55 %) a las 96 h con los valores obtenidos en los equipos PFP-M5-4 después de 144 horas de fermentación (62 y 56 %) resulta más lento el proceso que ocurre en el PFP-M5-4, igual podría decirse en el caso del PFP-M5-3 (48 %). Cabe mencionar, que a los agricultores de la Asociación de productores agropecuarios Valle de Echarati, les llamó mucho la atención que se produjera un proceso lento de fermentación del Chuncho, ya que por lo general este varietal logra el grado de fermentación adecuado en cinco días, así como que el grano preservó características de conservación buenas a los seis días de estar fuera de la mazorca.

Los tres prototipos operativos listos

El técnico Jhonny Huaylla listo para abrir el PFP-M5-4

Fase anaeróbica terminada

Aspecto de la masa de granos al séptimo día de fermentación

Ilustración 6. Escenas del PFP-M5-4 en operación.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 10, se presentan los valores por duplicado de pH, índice de acidez, capacidad antioxidante, polifenoles, cafeína y teobromina determinados para los granos de cacao Chuncho fermentados en PFP-M5-4, PFP-M5-3 y dos cajas de madera.

Tabla 10. Valores de pH, índice de acidez, capacidad antioxidante, polifenoles, cafeína y teobromina de granos de cacao Chuncho fermentado en los PFP-M5 y Caja Fermentadora.

Análisis	**Fermentador**				
	PFP-M5-4	PFP-M5-4	PFP-M5-3	Caja	Caja
pH 1	4.51	4.80	4.51	5.11	4.50
pH 2	4.51	4.76	4.51	5.12	4.50
Índice de acidez 1	1.36	1.14	0.35	1.04	1.77
Índice de acidez 2	1.36	1.14	0.35	1.04	1.77
Capacidad antioxidante 1	484444.9	535090.9	460445.3	495237.7	689778.03
Capacidad antioxidante 2	484253.5	534208.3	461785.7	495197.8	688917.07
Polifenoles 1	463.76	501.37	455.95	437.66	660.35
Polifenoles 2	463.76	502.37	458.95	437.66	662.35
Cafeína 1	0.17	0.19	0.16	0.27	0.25
Cafeína 2	0.17	0.19	0.17	0.28	0.27
Teobromina 1	0.50	0.57	0.44	0.48	0.44
Teobromina 2	0.47	0.51	0.42	0.48	0.48

Índice de acidez (g/10 g de muestra original)
Capacidad antioxidante (exp. en micromol de Trolox Equival/100 g de muestra)
Polifenoles (mg/100 g de muestra original; exp. en mg de Ácido Gálico Equival/100 g de muestra)
Cafeína (g/10 g de muestra original)
Teobromina (g/10 g de muestra original)
Fuente: Elaboración propia

La comparación estadística aplicando el Diseño Completo al Azar (DCA) entre los valores de pH, índice de acidez, capacidad antioxidante, polifenoles, cafeína y teobromina en granos de cacao Chuncho fermentados en el prototipo PFP-M5-4 y las caja de fermentación (tabla 10), da como resultado que no existe diferencia significativa ($P<0.05$) en pH, índice de acidez, capacidad antioxidante, polifenoles y teobromina entre los granos de cacao de ambos tipos de fermentadores, existiendo sí diferencia en cuanto a cafeína.

Rendimiento extracción de flavonoides

Para el desarrollo de este proyecto se colectaron frutos (mazorcas) de los clones TSH-505, ICS-1, ICS-95, IS60, FSV-41, IMC67 y CCN51. Por tanto las semillas en fresco fueron liofilizadas y posteriormente extraída con una mezcla de solventes agua:alcohol:ácido fórmico y las soluciones

extraídas sufrieron primero un proceso de destilación a presión reducida y seguidamente una liofilización hasta obtener un polvo de color rojizo (Ilustración 7), con rendimientos variados (Tabla 11).

Tabla 11. Rendimiento de extractos polifenólicos obtenidos.

Material	Peso inicial	Peso final	% rendimiento
ICS-60	840,78	85,78	10,20
TSH505	789,98	79,45	10,06
ICS95	838,12	80,96	9,66
IMC67	920,78	89,75	9,75
ICSI-1	889,78	90,12	10,13
CCN51	789,75	75,84	9,60

Polifenoles totales

Los valores de polifenoles totales tuvieron valores entre 128,22 y 66,63 mgeAG/g para los encapsulados obtenidos mediante el liofilizador, mientras que los obtenidos por secado por aspersión presentaron valores entre 35,24 y 18,05 mgeAG/g. Se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) entre los clones empleados en la liofilización y en los tratamientos realizados en el secado por aspersión. Estos valores se encuentran dentro de los rangos reportados por Carrillo, Londoño & Gil (2014), Pedan et al. (2018) con excepción de los clones ICS-60, ICS-1 y CCN51 que presentaron valores superiores a los reportados por estos autores. Varios estudios han demostrado una alta variación en el contenido de PT, estas variaciones son atribuidas a la genética del árbol cultivado, condiciones edafoclimáticas, madurez de los granos y el tiempo de almacenamiento después de la cosecha (Albertini et al., 2015; Oracz, Zyzelewicz y Nebesny 2015).

Los tratamientos con mayor contenido de PT fueron M8-140 con 34,76 ± 0,03 y A16-140 con 35,24 ± 11,31 mgeAG/g respectivamente. Los valores de PT obtenidos en el liofilizador fueron superiores a los de secado por aspersión, esto se explica por la ausencia de altas temperaturas en la primera metodología de encapsulación, permitiendo que durante el proceso no ocurran pérdidas considerables de polifenoles. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el proceso de liofilización involucra un mayor tiempo de operación del equipo (hasta 72 h), lo que puede elevar el costo del producto final, mientras que la encapsulación requiere menos tiempo para producir la misma o mayor cantidad de producto.

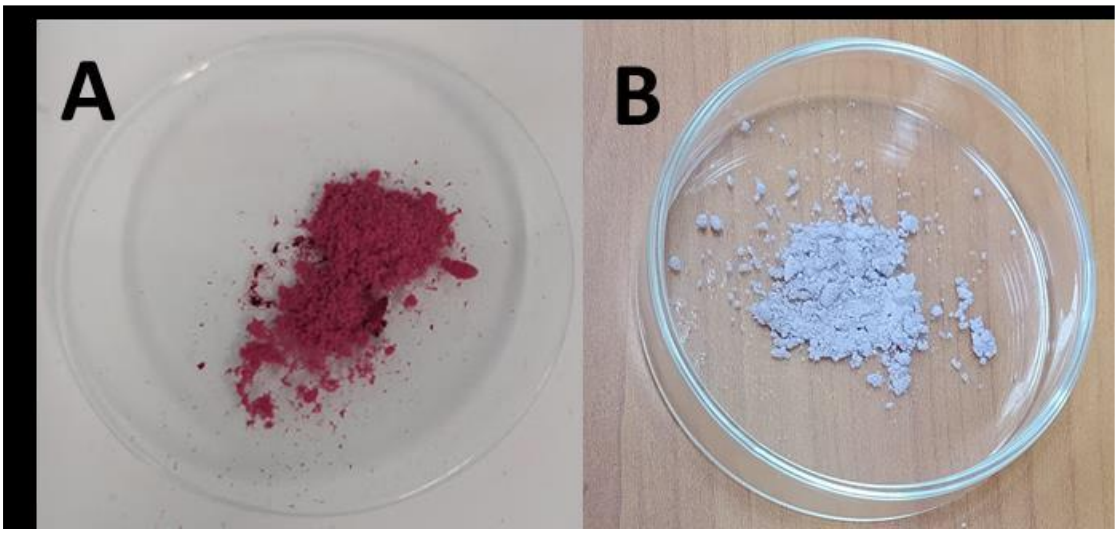


Ilustración 7. A) encapsulados obtenidos por liofilización . B) encapsulados obtenidos por secado por aspersión.

Capacidad antioxidante (CA)

Se encontraron diferencias significativas (P<0.05) en las tres pruebas antioxidantes realizadas; tanto para los clones empleados en la encapsulación por liofilización como para los tratamientos realizados en el secado por aspersión. El poder reductor evaluado por la metodología FRAP tuvo valores entre 1673,19 ± 14,04 y 307,20 ± 2,32 (µmolET/g) para los encapsulados obtenidos por liofilización; los clones de cacao con mayor CA en este método fueron ICS-1 y CCN51, mientras que para secado por aspersión los valores estuvieron entre 536,95 ± 21,50 y 107,41 ± 3,21 (µmolET/g), siendo el tratamiento A8-140 el que presentó el valor más alto para FRAP. Los resultados encontrados presentaron valores por encima de los reportados en la literatura para muestras de chocolate oscuro de diferentes orígenes y porcentajes de cacao. (Vertuani et al., 2014, Todorovic et al., 2015).

La actividad atrapadora del radical DPPH presentó valores entre 487,79 ± 9,68 y 289,48 ± 4,37(µmolET/g) para los encapsulados obtenidos por liofilización; los clones de cacao con mayor CA en este método fueron ICS-1 y CCN51, para secado por aspersión se mantuvieron en un rango de 201,99 ± 1,83 a 101,93 ± 2,43, siendo M8-140 el tratamiento con el valor más alto. Valores dentro de los rangos encontrados han sido reportados en muestras de cacao colombiano, brasileño y de chocolates producidos en serbia (Bustamante, Tenorio & Rojano, 2013, Batista et al., 2016, Todorovic et al., 2015).

Los valores de CA evaluada por el método (ORAC) estuvieron entre 119,937.34±2912 y 38650,99 ± 722 µmolET/100g para los encapsulados obtenidos por liofilización; los clones con mayor CA en esta metodología fueron ICS-1 e ICS-60, para secado por aspersión se mantuvieron en un rango de 73302,38 ± 5284 y 28306,12 ± 1803 µmolET/100g donde el tratamiento con mayor valor fue el M16-140. Los valores de ORAC encontrados en este trabajo son similares a los reportados por (Jean-Marie et al., 2021) para granos de cacao de la Guyana Francesa, a los de Carillo, Londoño y

Gil para almendras de cacao colombiano, a los encontrados por (Pallares et al.,2017) para el clon CCN51 y a los reportados en la base de datos ORAC del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Nutrient Data Laboratory, 2010).

Caracterización morfológica

Las micrografías electrónicas de barrido obtenidas de los encapsulados con maltodextrina y goma arábiga presentan una forma esférica irregular con algunas abolladuras en la superficie, no se encontraron diferencias en la morfológicas entre las dos temperaturas y las dos concentraciones de cada agente encapsulante utilizadas para el caso del secado por aspersión (Ilustración 8). Diferentes autores han obtenido resultados similares con goma arábiga y maltodextrina como materiales de pared en el secado por aspersión (Daza et al., 2016; Nogueira, Fakhouri & de Oliveira, 2019).

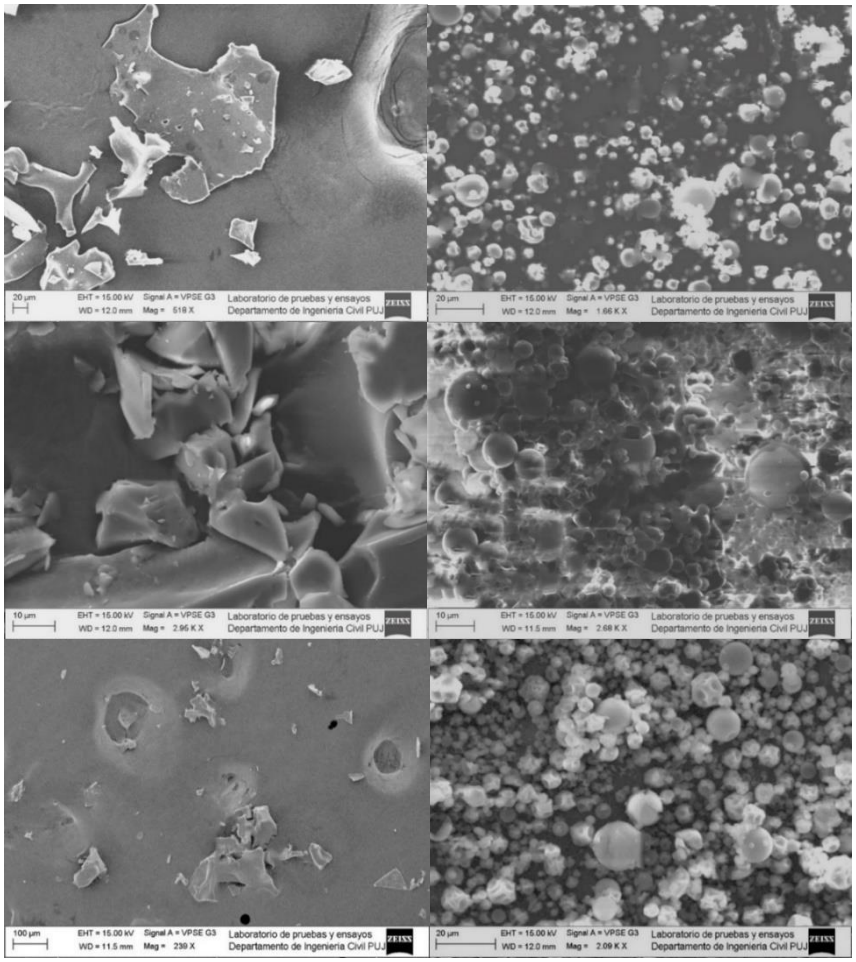


Ilustración 8. Microscopia electrónica para encapsulados liofilizados y secados por aspersión de clones de cacao.

Componente 4.

- *Participación en congresos año 2019*

Socialización de resultados sobre detección de cadmio en tres zonas de Colombia y Perú, utilizando el diseñó de un modelo espacial, allí se buscaba diseñar soluciones tecnológicas que permitan reducir a niveles permisibles o eliminar los contenidos de cadmio en los tejidos de las plantas de cultivo. Eso plantea que una de las posibles estrategias de manejo para evitar el problema de la acumulación de cadmio en los tejidos sería la aplicación de materiales que tenga altos contenidos de magnesio, sin concluir de una vez que esa práctica vaya a ser efectiva pero que podría tener alguna posibilidad.

Ponencia: Estudio de relaciones en la adsorción de cadmio en cacao y algunas propiedades químicas del suelo
Congreso: XIX Congreso Colombiano de la ciencia del suelo
Fecha: 23 -25 de octubre 2019

Ponencia: Cadmio en los agroecosistemas cacaoteros: mecanismos, opciones de manejo y experiencias.
Congreso: Congreso internacional de ciencia y tecnología en el trópico cacao
Fecha: 14 – 15 de agosto 2019

- *Participación en congresos año 2020*

Se realizó la encapsulación de extractos de flavonoides de 6 materiales altamente cultivados en Colombia, encapsulados mediante liofilización, su caracterización se presentó en los siguientes trabajos.
Poster y ponencias

1. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE COMPUESTOS MAYORITARIOS EN CLONES
2. PROPIEDADES FUNCIONALES DE UN ENCAPSULADO RICO EN POLIFENOLES EXTRAÍDOS DE Theobroma cacao L.
3. IDENTIFICACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y ENZIMÁTICO DE CLONES COLOMBIANOS DE Theobroma cacao L.

Congreso. LV CONGRESO NACIONAL Y VI INTERNACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS VIRTUAL realizado
Fecha: noviembre 5 – 7 de 2020.

En el marco del proyecto se llevó a cabo una caracterización morfoagronomica y sensorial, basada en descriptores cualitativos y cuantitativos para ocho materiales encontrados en seis municipios del departamento del Tolima.

Ponencia: Theobroma en el departamento del Tolima, calidad diferenciada para mercados de

mayor valor.
Congreso: Congreso Internacional de cacao, presente y futuro de la cacaocultura con el COVID-19 con la ponencia
Fecha: 2-4 diciembre 2020

- *Participación en congresos año 2021*

Especies de Bacillus subtilis y Bacilus megaterium prevalecen en la etapa final de la fermentación, pero su papel no ha sido completamente establecido, algunos Las investigaciones indican que este grupo puede influir en la calidad del frijol y también en su sabor y aroma (Schwan & Wheals., 2014) Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue seleccionar y aislar cepas de Bacillus de la fermentación del cacao y evaluar su efecto sobre el proceso de fermentación del clon CCN51, obteniendo como resultados, que las especies de Bacillus son tardías microorganismos en la fermentación del cacao que muestran un potencial enzimático como pectinasa, proteasa y citrato permease, por lo tanto, se puede recomendar su uso en las últimas etapas de la fermentación debido a la actividad antifúngica y la mejora de las características aromáticas del producto fermentado
Poster: Isolation, selection and evaluation of species of bacillus on the fermentation of cacao beans in Tolima – Colombia
Congreso: V Congreso Internacional en Investigación e innovación en ingeniería, ciencia y tecnológica de los alimentos- IICTA 2021
Fechas: 13 -15 de octubre 2021
Reconocimiento por mejor trabajo en modalidad poster.

Este proyecto evaluó bajo condiciones de invernadero el efecto de diferentes niveles de cadmio sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de cacao inoculadas y no inoculadas con hongos micorrícico arbusculares, y el efecto de la adición al suelo de varias enmiendas agrícolas. Los resultados demostraron que el crecimiento de las plantas no se vio afectado por los niveles de cadmio en el suelo, lo que confirma el alto nivel de tolerancia de esta especie vegetal al cadmio, sin embargo, si se observó un efecto de los tratamientos sobre el contenido en hojas de este elemento tóxico. El tratamiento con micorrizas solas o en combinación con cal dolomita llevó a una reducción en los niveles de cadmio foliar.

Presentación: inoculación con micorrizas arbusculares reduce la acumulación de cadmio foliar en plantas de cacao bajo condiciones de invernadero (poster)
Congreso: XXX reunión latinoamericana de rizobiologia y V conferencia latinoamericana de microorganismos promotores del crecimiento vegetal.
Fecha: 4 al 8 de octubre del 2021.

Poster “Compuestos de Theobroma cacao L: Estudio in silico como inhibidores de la proteasa principal de SARS-CoV-2” en el 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, el VIII

COLACRO, el X COCOCRO, el II SPAE y el IV C2B2. Llevado a cabo en la ciudad de Cartagena, Colombia del 11 al 15 de octubre de 2021.

- Artículos

Título	**Autores**	**Revista**	**Proceso de publicación**
Aplicación de micorrizas arbusculares y enmiendas químicas al suelo, como estrategia para la disminución de la absorción de cadmio en cacao*	Carlos Patiño	Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, de la Unicauca	RECIBIDO PARA REVISIÓN
Differentiated Cadmium uptake of six cacao genotypes (Theobroma cacao L.) in San Ramón, central Peruvian jungle	Alberto Julca-Otiniano Ricardo Borjas-Ventura1 Noel Bello-Medina1 Segundo Bello-Amez2 Leonel Alvarado-Huaman1 Diana Rebaza-Fernandez2 Viviana Castro-Cepero1	Chilean Journal of Agricultural Research	RECIBIDO PARA REVISIÓN
Relaciones entre los contenidos de cadmio en almendras de cacao y variables edáficas en zonas productoras de Colombia	Carlos Patiño Angélica Sandoval	Revista UDCA	RECIBIDO PARA REVISIÓN
Evaluación morfoagronomica y sensorial de ocho materiales nativos de Theobroma Cacao L. en tres zonas de Colombia	Heidi Horta Angélica Sandoval, Giann Peñaloza, Jonh Jairo Mendez	Revista DYNA	RECIBIDO PARA REVISIÓN
Theobroma cacao L. compounds: Theoretical study and molecular modeling as inhibitors of main SARS-CoV-2 protease	Olimpo Beltran Osvaldo Yanez Manuel Isaías Osorio Carlos Areche Alejandro Vasquez-Espinal Jessica Bravo d Angélica Sandoval-Aldana José Perez-Donoso Fernando Gonzalez-Nilo Maria Joao Matos h Edison Osorio i William Tiznado a	Biomedicine & Pharmacotherapy	PUBLICADO
Antioxidant activity, total polyphenols and methylxanthine ratio for the selection of new promising cocoa trees from Tolima, Colombia	Juan Borja Fajardo Heidi Horta Tellez1, Giann Peñaloza Atuesta2, Angélica Sandoval Aldana1, Jonh Mendez Arteaga2	Agronomy	RECIBIDO PARA REVISIÓN

Talleres con comunidad beneficiaria

En el marco del proyecto se realizaron dos talleres presenciales con la comunidad beneficiaria de Colombia y Perú, en el año 2019. Con una participación superior a 200 personas, realizada en las zonas de influencia del proyecto.

En el año 2020 y 2021, debido a las restricciones por la pandemia global se realizaron ciclos de conferencias virtuales para la socialización de avance de resultados y presentación final en Colombia y Perú. Utilizando la plataforma Zoom para el año 2020 y Webex para el año 2021, se logró la meta de 2700 personas capacitadas en los avances realizados en el proyecto. Encontrando un marcado interés en el sector cacaotero de los dos países.

Ilustración 9. Invitación al ciclo de conferencia virtual realizado en el año 2021.

Para el ciclo de conferencias virtuales se realizaron videos promocionales del proyecto, así como un video animado ilustrativo sobre la importancia de un adecuado proceso poscosecha para garantizar la calidad del grano de cacao, si la meta es llegar a chocolatería fina.

Link video promocional con productores https://youtu.be/vnpn6jKEiCs

Link video animado postcosecha cacao https://youtu.be/HOKMgUorQ3I

Indicadores Técnicos

Equipos financiados con recursos CT
Fortalecimiento del laboratorio de microbiología de suelos de la Universidad del Tolima

Bases de datos creadas
2 bases de datos, microorganismos aislados, conservados a -18°C en glicerol. Microorganismo para futuras pruebas de resistencia y generación de inóculo (Colombia y Perú).
2 bases de datos sobre caracterización edafológica y presencia de cadmio en tres zonas productoras por país (Colombia y Perú).

Paquete tecnológico
Enmienda de suelos con alto contenido de cadmio con la aplicación de cal dolomita y uso de rizosferas arbusculares.

Modelos técnicos diseñados:
2 prototipos para fermentación con llantas recicladas, M 4 (Colombia) y M 5 (Perú).
Prototipo para encapsulación de flanovoides de cacao utilizando secado por aspersión y liofilización.

Talleres de capacitación realizados:
2 Talleres 2019
I ciclo de conferencias 2020 – 3 Charlas virtuales
II ciclo de conferencias 2021 - 4 Charlas virtuales
Pruebas en campo prototipo

Documentos de trabajo realizados
5 documentos de trabajo, Sistema de Información geográfica, caracterización de materiales, caracterización de suelos, pruebas de cadmio en vivero y encapsulación de flavonoides de cacao.

Materiales genéticos
4 materiales georeferenciados y caracterizados para Colombia, definidos con características sobresalientes en aroma y sabor
2 materiales georeferenciados y caracterizados para Perú, definidos con características sobresalientes en aroma y sabor

Participación en congresos internacionales 7.
Artículos sometidos 5, publicados 1.

Hallazgos Destacados

Se generó un sistema de información geográfico específico para el cultivo de cacao en tres zonas productoras por país, donde se encuentra la información de las condicionales edafoclimáticas que influyen en la calidad organoléptica de los materiales, así como los materiales georeferenciados que presentaron una calidad diferenciada. Se define, así mismo las zonas homologas generadas para posibles siembras futuras de estos materiales.

Se logró el diseño de un fermentador ecológico, utilizando llantas recicladas. Al validarlo en campo a los productores les gustó el diseño y la capacidad de almacenar las semillas de cacao.

Se logró la estandarización a escala laboratorio de la encapsulación de compuestos de flavonoides presentes en el cacao.

Se aislaron diferentes microorganismos asociados al proceso de fermentación de cacao, los cuales se conservan en congelación para su preservación y futuro uso. Se realizó un trabajo específico con el uso de bacillus y se identificaron que esta especie aporta en la calidad sensorial final del proceso de fermentación.

Se validó a nivel vivero una enmienda al suelo contaminado con cadmio, la adición de cal dolomita y el uso de rizosferas arbusculares disminuyó la adsorción de cadmio a nivel de hojas. Se identificaron algunos clones de mayor resistencia al cadmio como el CCN 51.

Historias en el campo

Al realizar la validación en campo del prototipo de fermentador utilizando llantas recicladas, con respecto al comportamiento térmico de los prototipos ensayados PFP-M5-4 y PFP-M5-3, se puede explicar tal fenómeno debido a que los 50 kg de material a fermentar, colgados de los tubos de PVC, preformando un cilindro de 14 pulgadas (35.56 cm), protegido y aislado térmicamente del ambiente al estar dentro de la pila de neumáticos, los productores expresaron “es como pasar el cacao de la mazorca natural a una gran mazorca tecnológica”; es por ello que se pensó que el PFP-M5-4 podría ser mejorado para convertirse en un SISTEMA DE ALMACENAMIENTO DE GRANOS DE CACAO RECIÉN EXTRAIDOS DE LA MAZORCA”. La idea, fue saludada y respaldada por los agricultores y personal técnico de la Asociación.

Para el uso del prototipo se requiere el escurrido previo del grano, estos lixiviados pueden ser aprovechados para generación de otros productos, tipo néctar, lo cual se validó en campo con los productores, encontrando otra bondad del uso del prototipo.

Discusión

Componente 1. Zonificación de ambientes y materiales de cacao de calidad diferenciada

El uso de herramientas metodológicas que permitan conocer la viabilidad del territorio para el establecimiento de los diferentes cultivos se constituye en un instrumento de planificación muy importante para las zonas rurales de los países del área andina. Históricamente en muchos lugares se han venido estableciendo cultivos en diferentes regiones, desconociendo el potencial biofísico de las tierras, lo que ha conllevado en muchos casos al fracaso económico de los agricultores porque la oferta ambiental (características de las unidades de tierra) no tienen la aptitud requerida para el desarrollo óptimo de los cultivos.

En este contexto, esquemas metodológicos como el de la evaluación de tierras propuesto por FAO (1985), en la que se propone, para la determinación de la aptitud de las tierras para cultivos específicos, un completo análisis desde la perspectiva socioeconómica, biofísica y ambiental del territorio. En Colombia, así como en Perú, y en diferentes lugares del mundo, ya se han realizado ejercicios aplicativos de esta metodología con muy buenos resultados en términos de la determinación de la viabilidad del territorio para diferentes cultivos, garantizando para los agricultores muy buenas posibilidades de éxito en la implementación de estos.

Dentro de los resultados obtenidos se lograron delimitar, de manera espacial, las zonas con diferente grado de aptitud biofísica, así como las zonas no aptas para el establecimiento del cultivo en las regiones estudiadas. Se obtuvo una salida cartográfica cuya información de bases se tomó a escala 1:100.000, en la que se pueden observar las áreas zonificadas con los diferentes niveles de aptitud para el cultivo. Es importante resaltar, que debido a la escala a la cual se tomó la información biofísica, el alcance de esta información tiene aplicabilidad a nivel regional y no a nivel de predio.

Respecto a la evaluación de características químicas se realizó pruebas sobre el contenido de polifenoles totales para los materiales evaluados. Los polifenoles totales son dependientes de varios factores como la madurez, variedades de cacao, reacciones químicas, procesamiento, almacenamiento. Así como también la fermentación y el secado de granos de cacao y el tratamiento de postcosecha. En este estudio se llevó a cabo el análisis de polifenoles totales de granos sin fermentar, dichos polifenoles contribuyen usualmente del 12 al 18% del peso seco del grano de cacao, y están asociados con el aroma y color característico del chocolate. Según Peláez et al. (2016) el contenido de polifenoles totales en granos de cacao híbrido forastero y CCN-51 no fermentado es aproximadamente del 70,1 mgEAG/g, siendo esto muy similar a lo encontrado para los materiales T14-1 y T14-2, en Colombia y los tres materiales definidos en Perú.

Uno de los métodos para medir esta capacidad antioxidante es mediante FRAP, donde se encontró que el material con mayor poder reductor fue la muestra T12-1 correspondiente al departamento del Tolima con un valor de 9.46 µmolET/g. Todos los valores encontrados se encuentran dentro de lo reportado por otros autores (Ortega et al., 2010; Rodríguez-Carrasco et al., 2018). Otro método que se tuvo en cuenta para medir la capacidad antioxidante fue el método DPPH, en el cual se mide la capacidad de inhibición del radical DPPH (IC50). En este método se logró observar que los materiales que tuvieron mayor eficiencia frente al radical DPPH fueron los materiales T14-1, T14-2 y T15-1 los cuales contaron con valores entre 21.6 y 20.64 µmolET/g, altos valores de inhibición del radical DPPH también han sido encontrados en materiales genéticos como ICS 01 y I-21. Los materiales que tuvieron menores valores de inhibición pueden ser comparativos a clones como el ICS 95 y SCA-12 que cuentan con dicha similitud (Amudhan & Apshara, 2015).

El creciente interés en la evaluación de la actividad antioxidante en matrices complejas se ha dirigido al desarrollo de nuevas metodologías y/o la mejora de los conocidos. El método ORAC tiene en cuenta tanto porcentaje de inhibición y tiempo de inhibición del radical peroxilo, es por ello por lo que se ha usado como tercer método de medición del contenido de capacidad antioxidante de los 27 materiales que se evalúan en este proyecto. Este método nos permitió observar datos obtenidos entre 7029 y 17292 µmolET/100 g, dichos resultados se encuentran dentro del rango de lo reportado por otros autores (Wu, Ou & Prior, 2006; Zapata, Tamayo & Alberto, 2013). Finalmente cabe resaltar que los diferentes materiales evaluados tienen una actividad antioxidante superior a la gran mayoría de frutas y hortalizas reportadas.

Finalmente, con el fin de verificar la calidad sensorial de los materiales recolectados se hizo una evaluación sensorial junto con a un panel entrenado, el cual evaluó diferentes características a nivel de aroma y sabor, dicho panel destacó los atributos de los materiales se encontraron atributos deseables como el sabor a cacao, floral, frutal y nuez.

Componente 2. Manejo agronómico

De acuerdo con consideraciones teóricas, el calcio tiene mayor fuerza de adsorción que el cadmio, y éste mayor que la del magnesio. Cuando las concentraciones de calcio son altas, es decir, las relaciones Ca/Mg tienen valores altos, el calcio desplaza completamente al cadmio de los sitios de intercambio, y si las concentraciones de cadmio disponible son altas, llevaría a una mayor tasa de absorción por las plantas. Igual ocurre cuando las concentraciones de magnesio son altas, normalmente muy superiores a las que presenta el cadmio. Pese a que el cadmio se adsorbe con mayor fuerza sobre las superficies sólidas del suelo, por simple acción de masas y por competencia, el cadmio será desplazado de los sitios de intercambio por los átomos de magnesio, y tomado por las plantas. Se propone que sólo cuando se logra un equilibrio Ca/Mg, dentro de un rango muy estrecho de variación, el cadmio puede absorberse en cantidad suficiente para evitar ser absorbido por las raíces de las plantas de cacao. Esta hipótesis debe evaluarse con experimentos posteriores.

Cabe señalar, por último, que el manejo agronómico se considera la forma más económica y eficiente de mitigar el estrés por cadmio, y, por tanto, con base en los resultados de los presentes ensayos, la aplicación de hongos micorrícicos solos o en conjunto con ciertos niveles de cal dolomita podrían ayudar a reducir la absorción y acumulación de cadmio en el cultivo del cacao.

En los cinco genotipos de cacao, hubo una tasa creciente de acumulación de cadmio, tanto en hojas como en raíces. Pero la mayor acumulación ocurrió en las raíces, con una menor traslocación hacia las partes aéreas de la planta, en este caso las hojas, tal como lo informaron Stritsis & Claassen (2013). También se ha reportado que la acumulación del cadmio en el cacao es mayor en las hojas que en los granos como lo señalan Gramlich et al. (2018). Además, la respuesta es dependiente de la cantidad de cadmio aplicada al sustrato. Retamal-Salgado et al. (2017), encontraron que, en suelos enriquecidos con tasas crecientes de cadmio, el rendimiento no se vio afectado; pero los tejidos vegetales mostraron diferencias en la concentración de cadmio y también hubo diferencias de extracción entre los cultivares. Argüello et al. (2019), también encontró que cuando se añade más cadmio al sustrato, mayor es el contenido de este elemento en la planta. Cuando se analizó el contenido de cadmio en las hojas entre los genotipos; en el CCN-51 se reportó los niveles más altos y varió desde 0.01 hasta 5.32 mg de cadmio/100 g de materia seca (ms), para el testigo y el tratamiento con la dosis más alta de cadmio (150 ppm), respectivamente. El menor contenido correspondió al POUND-7, en la que se registró valores de 0.02, 1.56, 2.17 y 3.56 mg de cadmio/100 g de ms para las dosis de 0, 50, 100 y 150 ppm de cadmio, respectivamente. El contenido en las raíces fue mayor comparado con las hojas, pero también varía, según el genotipo. En el CCN-51 se reportó los niveles más bajos y varió desde 0.04 hasta 12.46 mg de cadmio/100 g de materia seca (ms), para el testigo y el tratamiento con la dosis más alta de cadmio (150 ppm), respectivamente. El mayor contenido correspondió al POUND-7, en la que se registró valores de 0.04, 4.56, 17.61 y 32.15 mg de cadmio/100 g de ms para las dosis de 0, 50, 100 y 150 ppm de cadmio, respectivamente.

Componente 3. Innovación y desarrollo de nuevos productos

Las bacterias esporogénicas participan durante la fermentación del cacao al ser capaces de producir una variedad de compuestos químicos que contribuyen en el grado de acidez de los granos de cacao durante el proceso (Schwan & Wheals, 2004).

En el presente estudio, el máximo nivel poblacional de las bacterias esporogénicas se observó en los fermentos de la T3. El máximo nivel poblacional de este grupo microbiano se da en las fases más tardías de la fermentación (alrededor de los 5-8 días), en las que condiciones como pH (entre 4-5), temperatura (por encima de los 45°C) y nivel de oxigenación alcanzan valores óptimos para su crecimiento (Schwan *et al.,* 1986). Sin embargo, pueden estar también presentes en etapas más tempranas de proceso (Sarbu & Csutak, 2019).

Los fermentos analizados en el presente estudio mostraron una amplia diversidad morfológica de este grupo microbiano, al poder detectarse colonias de diferentes tamaños, formas y coloración.

En función a dicha diversidad, se seleccionó una cepa representante de los diferentes morfotipos detectados para la correspondiente

Dentro del género *Bacillus*, las cepas mostraron estar relacionadas filogenéticamente a las especies *B. circulans, B. aryabhattai, B. paramycoides,B. albus, B. wudalianchiensis, B. subtilis*y *B. megaterium.* La presencia de este género bacteriano en la fermentación ha sido ampliamente descrita y reportada. Su máximo nivel poblacional se da en fases tardías de la fermentación, en la cual la principal actividad metabólica es producir proteínas proteolíticas cuya acción proporciona al grano de cacao sabores y olores desagradables, pero que podrían aportar en el sabor con la producción de compuestos saborizantes tales como 2,3-butanodiol y ácidos orgánicos (Ardhana y Fleet, 2003).

B. aryabhattai ha sido aislado por primera vez de muestras de aire sobre atmosférico en criotubos de colección, y se encuentra filogenéticamente relacionado a *B. megaterium* (Shivaji *et al.,* 2009). Ha sido aislado de diferentes ambientes, tales como suelo y rizosfera (Pailan *et al.,* 2015; Mesa *et al.,* 2015). Dicha especie posee una gran capacidad metabólica al ser reportada como promotora de crecimiento de plantas (Park *et al.,* 2017). Así también, se ha reportado que una cepa de dicha especie es capaz de producir compuestos aromáticos de manera natural tales como la vainilla y 4-vinylguaiacol, y de presentar actividad celulasa, lactasa, lipasa y pectinasa (Paz *et al.,* 2016), haciendo de esta especie relevante a nivel biotecnológico.

B. paramycoides y *B. albus* son especies capaces de crecer a temperaturas alrededor de los 40 °C, y que a nivel taxonómico pertenecen al grupo de *Bacillus cereus* (Liu *et al.,* 2017)*,* siendo reportado este último participe en el proceso de fermentación del cacao junto con *B. subtilis, B. megaterium* y *B. pumilus* (Ardhana y Fleet, 2003; Nielsen *et al.,* 2007; Pereira *et al.,* 2012).

Por otro lado, *B. subtilis* ha sido identificado presente en sistemas de fermentación en Ghana y Malasia (Carr *et al.,* 1979; Carr y Davies, 1980). En particular, se ha reportado que la producción de 2,3, 5, 6 tetrametil pirazina por parte de *Bacillus* es uno de los mayores componentes aportantes de aroma del cacao (Serra, 2005). Así también, la importancia del género *Bacillus* radica en su acción complementaria de despectinización de la pulpa en fases más tardías del proceso fermentativo (Ouattara, Reverchon, Niamke, y Nasser, 2011).

B. wudalianchiensis, aislada por primera vez por Li *et al.* (2017) a partir de muestras de grass, y actualmente reclasificada como *Pseudobacillus wudalianchiensis*, es una especie capaz de crecer entre los 10 y 60°C (Verma *et al.,* 2019). Dichos valores aluden a la capacidad de dicha especie de estar presente en el proceso de fermentación del cacao, el cual se caracterizó, de acuerdo con el registro, de encontrarse entre los 45 y 49 °C. Sin embargo, aún no se tiene información o reporte de la participación de esta especie en el proceso de la fermentación del cacao.

Se identificó también la presencia de cepas de los géneros *Lysinibacillus*. El género *Lysinibacillus* ha sido identificado en diferentes procesos de fermentación (Chettri y Tamang, 2015; Chakrabarty *et al.,* 2014). *L. telephonicus* se encuentra filogenéticamente emparentada a la especie *L. sphaericus*. En el caso particular del cacao, dicha especie ha sido reportada en diferentes estudios en Brasil, Ghana, Malasia, Trinidad, Indonesia y República Dominicana (Ardhana y Fleet 2003; Schwan y Wheals 2004; Camu *et al.* 2007; Lagunes Gálvez *et al.* 2007; Nielsen *et al.* 2007; Daniel *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2013). Algunas cepas de este género han sido detectadas como endógenas de la planta de cacao, y que presentan una acción antagonista frente a fitopatógenos tales como *Phytophthora capsici, Moniliophthora roreri,* y *M. perniciosa* (Melnick *et al.,* 2011). Por otro todo, *L. macroides* se encontró cercanamente emparentada a *L.* boronitolerans (fig. 8), la cual ha sido originalmente aislada de productos fermentados de soya en Corea (Nam *et al.,* 2012).

Desde la antigüedad el chocolate era consumido de manera exclusiva por placer, sin embargo, con el transcurrir de los tiempos y con el estudio realizado en su composición y beneficios que pueden presentar, investigadores han concluido que productos desarrollados en base a cacao muestran efectos favorables a la salud humana (Latif 2013; Smith 2013). Esto ha permitido que se proyecten y realicen numerables estudios clínicos y epidemiológicos, que han concluido que al consumir de manera regular productos derivados del cacao se puede tener efectos que prevengan la expresión de enfermedades crónicas como; enfermedades cardiometabólicas, cánceres, cardivasculares y enfermedades neurodegenerativas (Beg et al. 2017; Castell, Yuan et al., 2017), además, tienen una elevada actividad antioxidante y de la inhibición de ciertas enzimas incluidas las que participan en el desarrollo de procesos inflamatorios (Latif 2013; Tomas-Barberan et al. 2007), que se relacionan con la disminución del riesgo de eventos cardiovasculares al disminuyendo la presión arterial, ejerciendo efectos metabólicos y antiateroscleróticos, así como mejorando la función endotelial (Aprotosoaie et al. 2016; De Araujo et al. 2016). Estos compuestos bioactivos presente en los granos de cacao y otras partes del vegetal permiten pensar en el desarrollo y fabricación de alimentos funcionales y nutracéuticos.

Componente 4. Transferencia de conocimiento y tecnología.

La investigación realizada en cacao es muy importante a nivel mundial, el interés por esta especie ha crecido en los últimos años considerando las dinámicas del mercado. Por lo anterior existió una respuesta muy positiva a las convocatorias realizadas en forma presencial y virtual logrando la meta de beneficiarios definida en el proyecto.

Conclusiones

- En general, los suelos de las zonas cacaoteras analizadas, tanto del departamento del Tolima como del Huila, así como de las regiones peruanas, son suelos con capacidades medias y buenas para la producción del cultivo del cacao, en particular, por sus condiciones de fertilidad química. Según los resultados de clima y topografía, ambas zonas productoras en Perú y Colombia, presentan condiciones climáticas y topográficas óptimas para la producción de cacao, siendo posible la ampliación de la frontera de este cultivo, considerando los materiales seleccionados en el proyecto por su buena calidad.

- Las zonas productoras de Cusco y San Martín presentan características similares para la producción del cultivo de cacao, considerándose zonas homólogas por lo que pueden establecerse materiales semejantes considerando una buena productividad y calidad. Para Perú se seleccionaron tres árboles con características diferenciadas de productividad y calidad organoléptica.

- En Colombia, se logró la identificación de ocho materiales, cuatro en cada departamento, fue posible generar zonas homologas para estos materiales, sin embargo, los materiales encontrados en Huila pueden replicarse únicamente en ese departamento, en cambio los materiales encontrados en el departamento del Tolima, pueden buscar ser replicados en otras zonas de la región bajo estudio. Es necesario continuar con estudios agronómicos de estos materiales.

- Los productores de cacao del Huila, en comparación con los localizados al sur del departamento del Tolima, especialmente, demuestran un mejor nivel de competitividad, dada su capacidad de organización, mayor posibilidad de acceso a insumos agrícolas y mayor conocimiento de prácticas agronómicas adecuadas para sus cultivos. Esta situación se presenta en el Perú, donde las zonas productoras de Mariscal Cáceres y Tocache, evidencian un mayor nivel de competitividad que los productores de Cusco, debido a las mismas variables de estudio.

- En Colombia, muchos de los productores utilizan insumos químicos, especialmente insecticidas, sin contar con asesoría técnica y/o conocimiento profesional, lo cual los expone a riesgos de salud pública que deben evitarse. Esta mala práctica podría además tener efectos ambientalmente nocivos. En el caso del Perú, solo se evidenció utilización de insumos químicos en la región del Cusco.

- Los genotipos estudiados tuvieron una respuesta variable a las diferentes dosis de cadmio probadas. No hubo efecto significativo sobre el crecimiento y los valores alcanzado en las

variables evaluadas corresponden al potencial genético de cada uno de ellos. La capacidad de absorción de cadmio varió de un genotipo a otro. POUND-7 absorbió más cadmio y el CCN-51, mucho menos. Generalmente, la mayor concentración de este elemento se presentó en las raíces; pero en ningún caso, se observaron síntomas de fitotoxicidad.

- El análisis de varianza multivariado no arrojó diferencias estadísticas significativas entre los efectos de los tratamientos aplicados sobre las variables MFR, MFT, MFH y AP, ni en el caso de las interacciones ni tampoco en el caso de los factores principales. Independiente del tratamiento aplicado al suelo en el que crecieron las plantas de cacao bajo condiciones de invernadero, el crecimiento de las mismas no se vio afectado por la dosis de cadmio adicionado al suelo, incluso cuando se alcanzó 10 mg kg^{-1}, no obstante, la inoculación con hongos micorrícico arbusculares, solos o en combinación con cal dolomita, disminuyó la concentración del cadmio a nivel de las hojas, lo que permite proponer esta práctica como una estrategia agronómica para reducir la absorción de este elemento en suelos con altos niveles de contaminación.

- El proceso de fermentación es un sistema dinámico en donde la conversión de diferentes sustratos se realiza constante producto de la actividad microbiana, dicha actividad hace que cambios en las condiciones fisicoquímicos se den en el sistema, lo cual promueve a su vez la sucesión microbiana de determinados géneros bacterianos en particular.

- El presente trabajo permitió el estudio de la dinámica poblacional microbiana participe en el proceso de fermentación de granos de cacao, observándose una predominancia en diversidad del grupo de levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) en los primeros días del proceso, mientras que en las fases más tardías la predominancia perteneció al grupo de bacterias esporogénicas.

- Así también, la cuantificación de poblaciones microbianas permitió el aislamiento de diferentes cepas de levaduras, BAL y bacterias esporogénicas, todas ellas partícipes en el proceso de fermentación, obteniéndose información acerca de la diversidad fenotípica presente en cada grupo microbiano en estudio, detectándose en el caso de las levaduras cepas morfológicamente similares a los géneros *Candida y Saccharomyces.* Por otro lado, a nivel molecular, se pudo identificar la presencia de diferentes géneros microbianos relevantes tales como *Lactobacillus, Pediococcus, Bacillus, Lysinibacillus* y *Rummeliibacillus* en las diferentes muestras de fermentos de granos de cacao, los cuales participan activamente en la fermentación y transformación de la química del grano de cacao de la zona de Tocache.

- La presente información resulta relevante para el entendimiento de la microbiología del proceso de fermentación del cacao de la zona de Tocache - San Martín, así también el estudio de la diversidad taxonómica permitió identificar los principales géneros

microbianos que se encuentren implicados a nivel microbiológico y bioquímico, así como la posibilidad de encontrar especies nuevas potenciales que puedan estar implicadas en el proceso.

- La encapsulación de polifenoles de cacao es una alternativa innovadora que permitiría incursionar en nuevos nichos de mercado de mayor valor agregado, con un producto que garantiza un elevado contenido de compuestos bioactivos, ya sea para consumo directo o para el enriquecimiento antioxidante de matrices alimentarias. Todos los polvos obtenidos presentaron una elevada CA de acuerdo con los valores ORAC, a pesar de que se presentó un efecto negativo de la temperatura sobre la CA en el secado por aspersión, por lo que se recomienda emplear 140°C como temperatura de secado.

- Al Comparar los valores de PT y CA de liofilización y secado por aspersión, la primera metodología tuvo valores superiores para las cuatro variables evaluadas en comparación a la segunda, sin embargo, se debe considerar el tiempo y el consumo energético necesario para obtener el producto, siendo el secado por aspersión una técnica más rápida y menos costosa en estos dos aspectos, además de que permite obtener microencapsulados con geometría esférica, la cual garantiza una mayor protección en el encapsulado en especial si se desea incorporar en productos agroalimentarios.

- RECOMENDACIONES

- Instalar una red de estaciones meteorológicas en las zonas productoras de cacao que permita realizar estudios de Modelos de Cambio Climático para conocer la variabilidad climática hasta el año 2100, considerando que el cultivo de cacao es muy susceptible a sequía. Es necesario continuar con el monitoreo de los suelos para una caracterización agrícola de las nuevas áreas a incorporar. Continuar estudios agronómicos para siembras de los materiales seleccionados, incluir estudios de materiales resistentes al cambio climático.

- La importancia del problema del cadmio en cacao sugiere la necesidad de continuar investigando en este tema. Se debería evaluar la capacidad de absorción de una mayor cantidad de genotipos que se puedan usar como patrones en este cultivo. Deberían usarse otras técnicas, como las soluciones nutritivas para conocer mejor los mecanismos de absorción y evaluar parámetros fisiológicos, asociados con el estrés por cadmio y la resistencia a este elemento. La complejidad de este problema sugiere realizar investigaciones con enfoque multidisciplinario que considere todos los eslabones de la cadena de valor del cacao.

- La fermentación es una de las etapas más críticas del procesamiento de cacao, es necesario continuar con las mejoras tecnológicas, incluyendo el uso de inóculos de microorganismos aislados en las regiones productoras, así como mejores adaptaciones a los prototipos incluyendo material de relleno dentro de las llantas que garanticen mayor aislamiento y mejorar el control de temperatura.

- El desarrollo de productos para extracción de flavonoides de cacao sin fermentar, es una posibilidad muy alta para los mercados nacionales, se requiere estandarizar el proceso a escala banco e industrial, estudiando otras técnicas que garanticen la actividad antioxidante y a menor costo que la liofilización.

Referencias Bibliográficas

Albertini, B., Schoubben, A., Guarnaccia, D., Pinelli, F., Della Vecchia, M., Ricci, M., Blasi, P. (2015). Effect of fermentation and drying on cocoa polyphenols. *J Agric Food Chem, 63*(45), 9948-9953. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01062

Aldrete-Tapia, J. A., Escalante-Minakata, M. P., Martínez-Peniche, R. A., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2019).Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. *Food Microbiology, 103339.* doi:10.1016/j.fm.2019.103339

Alloway, B. (2013). "Heavy metals in soils". Third ed. Springer. 613 p.

Almeida, O.G.G.; Pinto, U.M.; Matos, C.B.; Frazilio, D.A.; Braga, V.F; Zeska-Kress, M.R. & De Martinis. E.C.P. (2020). Does Quorum Sensing play a role in microbial shifts along spontaneous fermentation of cocoa beans? An in-silico perspective. Food Research International, 131 (1), 1–12.

Amores, F. (2004). El concepto de calidad integral de cacao. Memorias-Taller internacional-calidad integral de cacao: teoría y práctica. Estación Experimental Pichilingue – Ecuador. 15-17.

Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 87–99. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3

Armijos, A. (2002). Características de la acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (Theobroma cacao L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación. Tesis de Licenciatura en química. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. 103.

Barrile, J.C., Ostovar, K., and Keeney, P.G. 1971. Microflora of cocoa beans before and after roasting at 150◦C. *J. Milk Food Technol*., 34:369– 371.

Batista, N. N., de Andrade, D. P., Ramos, C. L., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2016). Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. *Food Res Int, 90*, 313-319. doi: 10.1016/j.foodres.2016.10.028.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry, 239(1), 70-76.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28(1), 25-30.

Bustamante, S. Z., Tenorio, A. T., & Rojano, B. A. (2013). Effect of fermentation on the antioxidant activity of different Colombian cocoa clones. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *18*(3), 391-404.

Callebaut, B. (2009). Beauty from within-Chocolate manufacturer Barry Callebaut suggests that ACTICOA® can counter skin ageing. Food science & technology today, 23(4), 54.

Camu, N., DeWinter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M. and De Vuyst, L. (2007) Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Env. Microbiol*. 73,1809-1824.

Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International, 60*, 273-280. doi: 10.1016/j.foodres.2013.06.019

Castro, E.; Idrogo, G.; Siche, R. & Cardenas, F. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. (2018). Helyion, 5 (1), 1-29.

Chakrabarty, J.; Sharma, G. D.; Tamang, J. P. (2014). Traditional technology and product characterization of some lesser-known ethnic fermented foods and beverages of North Cachar Hills District of Assam. Indian J. Tradit. Know. 2014, 13, 706−715.

Daza, L. D., Fujita, A., Fávaro-Trindade, C. S., Rodrigues-Ract, J. N., Granato, D., & Genovese, M. I. (2016). Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (Eugenia dysenterica DC.) fruit extracts. *Food and Bioproducts Processing, 97*, 20-29. doi: 10.1016/j.fbp.2015.10.001

De Vuyst L, Weckx S. (2015). The Functional Role of Lactic Acid Bacteria in Cocoa Bean Fermentation*. Biotechnol Lact Acid Bact Nov Appl*. 2th Ed. pp 248–78.

De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(1), 5–17. https://doi.org/10.1111/jam.13045

Degryse, F.; Smolders, E. & Parker, D. (2009). "Partitioning of metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) in soils: concepts, methodologies, prediction and applications – a review". *European Journal of Soil Science*, 60: 590–612.

Doster N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. (2011). Cacao *Theobroma cacao* L. *Hoja botánica.* 2011;19 p. 4-21.

Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C., & Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (Theobroma cacao L.). *European Food Research and Technology, 229*(6), 937-948. doi:10.1007/s00217-009-1132-

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. Trends in Food Science & Technology, 21(10), 510-523. doi: 10.1016/j.tifs.2010.08.003.

Fang, Z., & Bhandari, B. (2012). Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation. In Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals (pp. 73-109).

FAO & OMS (2020). "Anteproyecto de código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por cadmio en los granos de cacao". Decima cuarta reunión. Comité del codex sobre contaminantes de los alimentos

FAO. CACAO: Operaciones Poscosecha. Disponible online en: http://www.fao.org/3/a-

au995s.pdf

Ferreira Nogueira, G., Matta Fakhouri, F., & de Oliveira, R. A. (2019). Incorporation of spray dried and freeze-dried blackberry particles in edible films: Morphology, stability to pH, sterilization and biodegradation. *Food Packaging and Shelf Life, 20*. doi: 10.1016/j.fpsl.2019.100313.

Figueroa, H.; Mota, J.; Ferrocino, I.; Hernández, Z.; Gonzales, O.; Cocolin, L. & Suarez, M. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. International Journal of Food Microbiology, 301 (1), 41–50.

Guijarro, J.A. 2004. Climatol: Software libre para la depuración y homogeneización de datos climatológicos. En: García-Codron et al. (Eds.). El clima, entre el Mar y la Montaña. Asociación Española de Climatología, A-4, pp. 493-502.

He, S.; He, Z.; Yang, X.; Stoffella, P. & Baligar, C. (2015). "Soil biogeochemistry, plant physiology, and phytoremediation of cadmium contaminated soils". Advances in Agronomy, 134: 135-225.

Hollenberg, N. (2006). Vascular action of cocoa flavanols in humans: The roots of the story. J. Cardiovasc. Pharmacol. 47: S99–S102.

ICCO (2007). "Cocoa Production." International Cocoa Organization. 2007, from http://www.icco.org/economics/promotion.aspx.

IDEAM, (1997): Preparémonos para recibir el fenómeno El Niño en los municipios colombianos. Santa Fe de Bogotá D.C., Agosto-1997, 114 páginas.

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INIAP. (2005). Establecimiento de parámetros físicos, químicos y organolépticos para diferenciar cacao fino y ordinario. Informe Técnico Anual. Quito (Ecuador). 8-10.

International Cocoa Organization - ICCO (2019). Statistics-Cocoa Prices- ICCO Monthly Averages of Daily Prices Recuperado de: https://www.icco.org/statistics/cocoa-prices/monthly-averages.html

Kadow D, Bohlmann J, Phillips W, Lieberei R. (2013). Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (Theobroma cacao L.). J Appl Bot FoodQual. 2013; 86:90–8. 55.

Kadow D, Niemenak N, Rohn S, Lieberei R. (2015). Fermentation-like incubation of cocoa seeds (Theobroma cacao L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process. LWT - *Food Sci Technol*. 2015;62 (1):357– 61. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.015

Kim O.S., Cho Y.J., Lee,K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S., Chun J. (2012). Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62:716–721.

Kirkham, M. B. (2006). "Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments". Geoderma 137: 19-32.

Kostinek, M., Ban-Koffi, L., Ottah-Atikpo, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., *et al.,* (2008). Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in

Nigeria. *Curr. Microbiol.* 56 (4), 306–314.
Lecumberri, E. et al. (2007). A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. Nutrition.2007 Apr;23(4):332-41n.
Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Foodmicrobiology*, *28*(3), 457-464.
Lima, L. J., van der Velpen, V., Wolkers-Rooijackers, J., Kamphuis, H. J., Zwietering, M. H., &Nout, M. R. (2012). Microbiota dynamics and diversity at different stages of industrial processing of cocoa beans into cocoa powder. *Appl. Environ. Microbiol.*, *78*(8), 2904-2913.
Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., & Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the Bacillus cereus group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(8), 2499–2508. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821
Lopes, A.S. and Dimick, P.S. (1995). Cocoa fermentation. In *Biotechnology: A comprehensive treatise*, vol. 9, pp. 563–577. Reed, G. and Nagodawithana, T.W., Eds. (2nd ed.), Enzymes, Food and Feed. Weinheim: VCH.
Martínez, G., & Palacio, C. (2010). "Determinación de metales pesados cadmio y plomo en suelos y en granos de cacao frescos y fermentados mediante espectroscopía de absorción atómica de llama". Bucaramanga, Colombia.
Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P.-J., Saels, V., Struyf, N., *et al.,* (2013). Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota*. PLoS One* 8 (12), e81559.
Melnick, R. L., Suárez, C., Bailey, B. A., & Backman, P. A. (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from Theobroma cacao as potential biological control agents of cacao diseases. Biological Control, 57(3), 236–*245.* doi:10.1016/j.biocontrol.2011.03.005
Mesa J., Mateos-Naranjo E., Caviedes M. A., Redondo-Gomez S., Pajuelo E., Rodriguez-Llorente I. D. (2015). Scouting contaminated estuaries: heavy metal resistant and plant growth promoting rhizobacteria in the native metal rhizo accumulator *Spartina maritima*. *Mar. Pollut. Bull.* 90 150–159. 10.1016/j.marpolbul.2014.11.002
Miguel, M. G. da C. P., Reis, L. V. de C., Efraim, P., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2017). Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. *LWT*, *77*, 362–369. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.076
Misnawi, Jinap S, Jamilah B, Nazamid S. (2005) Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. J Sci Food Agric. 2005;85(6):917–24
Montealegre J.E. Actualización del componente Meteorológico del modelo institucional del IDEAM sobre el efecto climático de los fenómenos El Niño y La Niña en Colombia, como insumo para el Atlas Climatológico. Bogotá, D.C., Agosto-2014.
Montealegre J.E., (2007): Actualización del componente Meteorológico del modelo institucional del IDEAM sobre el efecto climático de los fenómenos El Niño Y La Niña en Colombia. Contrato No 063 IDEAM – Bogotá, Colombia.
Moses, L. E. 2014. Wilcoxon-Mann-Whitney Test: Definition and Example. Wiley StatsRef:

Statistics Reference Online.

Nielsen, D.S., Snitkjaer, P and Van den Berg N. 2008. Investigating the fermentation of cocoa by correlating Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiles and Near Infrared spectra. *International Journal of Food Microbiology* 125 133-140

Nutrient Data Laboratory, U. S. D. A. (2010). Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected foods, 2. (pp. 39).

Oracz, J., Zyzelewicz, D., & Nebesny, E. (2015). The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (Theobroma cacao L.), depending on variety, growing region, and processing operations: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr, 55*(9), 1176-1192. doi:10.1080/10408398.2012.686934

Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First Action 2012.23. *Journal of AOAC International*, *96*(6), 1372-1376.

Ouattara, H. G., Reverchon, S., Niamke, S. L., & Nasser, W. (2011). Molecular identification and pectate lyase production by Bacillus strains involved in cocoa fermentation. *Food Microbiology*, *28*(1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.020

Pallares Pallares, A., Estupiñán A, M. R., Perea Villamil, J. A., & López Giraldo, L. J. (2017). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista ION, 29*(2), 7-21. doi:10.18273/revion. v29n2-2016001.

Papalexandratou Z, Lefeber T, Bahrim B, Lee OS, Daniel HM, De Vuyst L. (2013). Hanseniaspora opuntiae, Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus fermentum, and Acetobacter pasteurianus predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa. Food Microbiol. ;35(2):73–85.

Park Y-G, Mun B-G, Kang S-M, Hussain A, Shahzad R, Seo C-W, *et al.* (2017) Bacillus aryabhattai SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS ONE* 12(3): e0173203. doi:10.1371/journal.pone.0173203

Passos, F.M.L., Silva, D.O., Lopez, A., Ferreira, L.F., Guimarães, W.V. 1984. Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, 49, 205-208.

Paz, A., Carballo, J., Pérez, M. J., & Domínguez, J. M. (2016). *Bacillus aryabhattai* BA03: a novel approach to the production of natural value-added compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 32(10). doi:10.1007/s11274-016-2113-5

Pereira, G.V.M., Magalhães, K.T.,Almeida, E.G.,Coelho, I.S.C. and Schwan, R.F.(2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. *Int. J. Food Microbiol.* **161**, 121– 133.

Regulation (EU) 2015/539. COMMISSION REGULATION (EU) 2015/539 of 31 March 2015. Authorising a health claim made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health and amending Regulation (EU) No 432/2012

Rodriguez, Flores, M. & Rodriguez, Castellon (1982). "Lead and cadmium levels in soil and plants near highways and their correlation with traffic density Environ". Pollut. (Series B) 4: 281-290

Saltini, R., Akkerman, R., Frosch, S., (2013). Optimizing chocolate production through traceability: a review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. Food Control 29, 167–187.

Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The Microbiology of Cocoa Fermentation. In *Caffeinated and Cocoa Based Beverages* (2019 th ed., pp. 423–446). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1

Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M. Á., Muguerza, B., Ramón, D., & Ríos, J. L. (2010). Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. Food Research International, 43(6), 1614-1623.

Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(4), 205–221. https://doi.org/10.1080/10408690490464104

Serra, B.J., (2005). Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. Eur. Food Res. Technol. 221, 19e29

Shivaji S., Chaturvedi P., Begum Z., Pindi P. K., Manorama R., Padmanaban D. A., *et al.* (2009). Janibacterhoyleisp nov., *Bacillus isronensis* spnov and *Bacillus aryabhattai* sp nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 2977–2986. 10.1099/ijs.0.002527-0

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999.Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299, 152–178.

Smolders, E. 2001. "Cadmium Uptake by Plants". *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, Vol. 14, No. 2, 177—183, 2001

Todorovic, V., Redovnikovic, I. R., Todorovic, Z., Jankovic, G., Dodevska, M., & Sobajic, S. (2015). Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis, 41*, 137-143. doi: 10.1016/j.jfca.2015.01.018.

Verma, A., Pal, Y., Ojha, A. K., Kumari, M., Khatri, I., Rameshkumar, N., ... & Krishnamurthi, S. (2019). Taxonomic insights into the phylogeny of Bacillus badius and proposal for its reclassification to the genus Pseudobacillus as Pseudobacillus badius comb. nov. and reclassification of Bacillus wudalianchiensis Liu *et al.,* 2017 as Pseudobacillus wudalianchiensis comb. nov. *Systematic and applied microbiology*, *42*(3), 360-372.

Vertuani, S., Scalambra, E., Vittorio, T., Bino, A., Malisardi, G., Baldisserotto, A., & Manfredini, S.

(2014). Evaluation of antiradical activity of different cocoa and chocolate products: relation with lipid and protein composition. *J Med Food, 17*(4), 512-516. doi:10.1089/jmf.2013.0110.

Wacher R. (2011). Microorganismos y chocolate. Revista Digital Universitaria. 12(4): ISSN: 1067-6079. disponible online: http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/art42.pdf

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. & Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.

Willey, J. M., L.M. Sherwood and Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley, and Klein s Microbiology, NY, McGraw Hill, 7th Ed.

Wollgast, J. and Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Res. Int.33:423–447.

Wuana, R. & Okieimen, F. (2011). "Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation". ISRN Ecology, 2011: 1-20.

YAO W., Doue G., Goualie B., Koua G., NIamke S. (2017). Selection of potential *Bacillus* starters for cocoa beans fermentation improvement. *Food Technology*, 41(1): 131-146

Zak, D.L., Ostovar, K., and Keeney, P.G. (1972). Implication of *Bacillus subtilis* in the synthesis of tetramethylpyrazine during fermentation of cacao beans. *J. Food Sci.,* 37:967–968.

Instituciones participantes

Secretaría Técnica Administrativa

FONTAGRO

Con el apoyo de:

BID
Banco Interamericano de Desarrollo

IICA

www.fontagro.org
Correo electrónico: fontagro@fontagro.org