



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMÍA

**DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA EN MUESTRAS DE
CACAO RECOLECTADAS EN CENTROS DE ACOPIOS DE LA
PROVINCIA DE EL ORO.**

**ELIZALDE RODRIGUEZ JANDRY JAVIER
INGENIERO AGRONOMO**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMÍA

**DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA EN
MUESTRAS DE CACAO RECOLECTADAS EN CENTROS DE
ACOPIOS DE LA PROVINCIA DE EL ORO.**

**ELIZALDE RODRIGUEZ JANDRY JAVIER
INGENIERO AGRONOMO**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMÍA

TRABAJOS EXPERIMENTALES

**DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA EN
MUESTRAS DE CACAO RECOLECTADAS EN CENTROS DE
ACOPIOS DE LA PROVINCIA DE EL ORO.**

**ELIZALDE RODRIGUEZ JANDRY JAVIER
INGENIERO AGRONOMO**

QUEVEDO GUERRERO JOSE NICASIO

**MACHALA
2024**

DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA EN MUESTRAS DE CACAO RECOLECTADAS EN CENTRO DE ACOPIOS DE LA PROVINCIA DE EL ORO

8%
Textos sospechosos

3% Similitudes
0% similitudes entre comillas
0% entre las fuentes mencionadas

5% Idiomas no reconocidos

<p>Nombre del documento: DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA EN MUESTRAS DE CACAO RECOLECTADAS EN CENTRO DE ACOPIOS DE LA PROVINCIA DE EL ORO.docx</p> <p>ID del documento: 1b4524a92f645bd28eb97638490b01ea3214f39c</p> <p>Tamaño del documento original: 21,26 MB</p> <p>Autores: []</p>	<p>Depositante: JOSE NICASIO QUEVEDO GUERRERO</p> <p>Fecha de depósito: 17/2/2025</p> <p>Tipo de carga: interface</p> <p>fecha de fin de análisis: 17/2/2025</p>	<p>Número de palabras: 7982</p> <p>Número de caracteres: 54.358</p>
---	--	---



Fuentes principales detectadas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	scielo.isciii.es Cuantificación de aflatoxinas carcinogénicas en alimentos no procesados... 1 fuente similar	1%		Palabras idénticas: 1% (94 palabras)
2	www.scielo.org.pe Caracterización molecular de los microorganismos presentes d... 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (51 palabras)
3	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Ocratoxina A en cacao y derivados. Medida... 4 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (42 palabras)
4	poscosechacacao.com OCRATOXINA "A" EN CACAO Y SUS DERIVADOS. - Poscosech...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (40 palabras)
5	Documento de otro usuario #25c6c2 El documento proviene de otro grupo 4 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (23 palabras)

Fuentes con similitudes fortuitas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	ri.ues.edu.sv Determinación de ocratoxina A (OTA) en café instantáneo por ensayo ...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (34 palabras)
2	repositorio.espam.edu.ec	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (30 palabras)
3	portal.amelica.org EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LAS MICOTOXINAS ZEARALE...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (22 palabras)
4	repositorioinstitucional.buap.mx	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (21 palabras)
5	repositorioinstitucional.buap.mx	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (12 palabras)

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

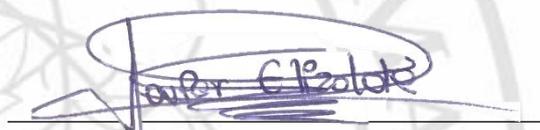
El que suscribe, ELIZALDE RODRIGUEZ JANDRY JAVIER, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA EN MUESTRAS DE CACAO RECOLECTADAS EN CENTROS DE ACOPIOS DE LA PROVINCIA DE EL ORO., otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



ELIZALDE RODRIGUEZ JANDRY JAVIER

0706253036

AGRADECIMIENTO

A Dios, fuente de fortaleza, sabiduría y guía constante en cada paso de mi vida. Sin Su luz y bendiciones, este camino no habría sido posible.

A mi madre y mi abuela, pilares fundamentales en mi formación personal y profesional. Su amor incondicional, sacrificio y enseñanzas son el motor que impulsa mis sueños.

A mi esposa y a mi hijo, quienes representan el amor y la alegría en mi vida. Su apoyo, paciencia y comprensión durante este proceso han sido mi refugio y mi mayor motivación para culminar este proyecto.

A mi tutor, Ing. José Quevedo por su orientación y dedicación. Su conocimiento y compromiso han sido esenciales para dar forma y profundidad a esta investigación.

A las empresas, cuya colaboración y disposición fueron clave para llevar a cabo este trabajo. Su apoyo no solo enriqueció mi tesis, sino que también me permitió crecer profesionalmente.

A todos los que, de una u otra forma, contribuyeron a que esta meta se hiciera realidad, mi más profundo agradecimiento.

Elizalde Rodríguez, Jandry J.

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, mi fortaleza y por iluminar cada paso de este camino. Sin Su sabiduría y Su amor infinito, este sueño no habría sido posible.

A mi madre, por su amor incondicional, sus sacrificios y por enseñarme el valor de la perseverancia. Tu ejemplo es mi mayor inspiración.

A mi abuela, por ser un pilar de sabiduría, cariño y fortaleza. Tus consejos y tus oraciones me han acompañado siempre.

A mi esposa, por tu paciencia, apoyo constante y por creer en mí incluso en los momentos más difíciles. Gracias por ser mi compañera de vida y por compartir cada desafío y logro.

A mi hijo, mi mayor motivación, por recordarme cada día que este esfuerzo es también para construir un mejor futuro para ti.

A cada uno de ustedes, con todo mi corazón, dedico este logro.

RESUMEN

DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA EN MUESTRAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) RECOLECTADAS EN CENTRO DE ACOPIOS DE LA PROVINCIA DE EL ORO.

AUTOR:

ELIZALDE RODRIGUEZ, JANDRY

TUTOR:

QUEVEDO GUERRERO, JOSÉ

Este estudio examina la carga microbiana en muestras de cacao recolectadas en los centros de acopio de la provincia de El Oro, Ecuador, con el propósito de identificar microorganismos contaminantes, especialmente hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales pueden comprometer la calidad y seguridad del producto. La investigación surge ante la preocupación creciente sobre la presencia de micotoxinas como la ocratoxina A (OTA) y las aflatoxinas, sustancias altamente tóxicas para la salud humana y sujetas a regulaciones internacionales.

Los resultados muestran que *Aspergillus niger* estuvo presente en el 80% de las muestras, seguido por *Aspergillus oryzae* (60%), *Aspergillus nidulans* (60%), *Aspergillus flavus* (40%), *Aspergillus carbonarius* (40%), *Aspergillus terreus* (40%) y *Penicillium sp.* (60%). La alta incidencia de estos hongos sugiere que las condiciones de almacenamiento y manejo en los centros de acopio podrían estar facilitando su proliferación, lo que supone un riesgo importante para la comercialización del cacao en mercados internacionales.

Se observó que Pasaje y Machala presentan la mayor diversidad fúngica, lo que indica que las prácticas de postcosecha en estas localidades requieren mejoras urgentes. En contraste, Santa Rosa mostró una menor diversidad de hongos, lo que podría deberse a mejores condiciones de almacenamiento y manejo. Estos hallazgos subrayan la necesidad de implementar estrategias de control, tales como la optimización del secado, el monitoreo de la humedad, la capacitación de los productores y el cumplimiento de normativas internacionales para reducir la carga microbiana y garantizar la calidad del cacao.

En conclusión, la contaminación por hongos en el cacao de la provincia de El Oro representa un problema que requiere atención inmediata para asegurar la inocuidad del producto. Se recomienda la aplicación de buenas prácticas agrícolas y postcosecha, el monitoreo continuo de la carga microbiana y la implementación de normativas de control para prevenir la contaminación fúngica y garantizar la seguridad alimentaria del cacao ecuatoriano.

Palabras claves: Cacao, Carga microbiana, Centros de acopio, Microorganismos contaminantes, Hongos *Aspergillus*, *Penicillium*, Micotoxinas, Ocratoxina A (OTA).

ABSTRACT

DETERMINATION OF MICROBIAL LOAD IN COCOA (*Theobroma cacao* L.)
SAMPLES COLLECTED FROM STORAGE CENTERS IN THE PROVINCE OF EL ORO.

AUTHOR:

ELIZALDE RODRIGUEZ, JANDRY

ADVISOR:

QUEVEDO GUERRERO, JOSÉ

This study examines the microbial load in cocoa samples collected from storage centers in the province of El Oro, Ecuador, with the aim of identifying contaminating microorganisms, particularly fungi of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera, which can compromise the quality and safety of the product. The research arises from growing concerns about the presence of mycotoxins such as ochratoxin A (OTA) and aflatoxins, highly toxic substances for human health and subject to international regulations.

The results show that *Aspergillus niger* was present in 80% of the samples, followed by *Aspergillus oryzae* (60%), *Aspergillus nidulans* (60%), *Aspergillus flavus* (40%), *Aspergillus carbonarius* (40%), *Aspergillus terreus* (40%), and *Penicillium sp.* (60%). The high incidence of these fungi suggests that storage and handling conditions at collection centers may be facilitating their proliferation, posing a significant risk to the commercialization of cocoa in international markets.

It was observed that Pasaje and Machala exhibit the highest fungal diversity, indicating that post-harvest practices in these locations require urgent improvements. In contrast, Santa Rosa showed lower fungal diversity, which could be attributed to better storage and handling conditions. These findings underscore the need to implement control strategies, such as optimizing drying processes, monitoring humidity levels, training producers, and complying with international regulations to reduce microbial load and ensure cocoa quality.

In conclusion, fungal contamination in cocoa from the province of El Oro represents a problem that requires immediate attention to ensure product safety. The application of good agricultural and post-harvest practices, continuous monitoring of microbial load, and the implementation of control regulations are recommended to prevent fungal contamination and guarantee the food safety of Ecuadorian cocoa.

Keywords: Cocoa, Microbial load, Storage centers, Contaminating microorganisms, *Aspergillus* fungi, *Penicillium*, Mycotoxins, Ochratoxin A (OTA).

INDICE

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA	12
2.1. Origen e Historia del Cacao en Ecuador	12
2.2. El Cacao en la Provincia de El Oro	13
2.3. Factores que influyen en la contaminación microbiana del cacao.....	13
2.4. Principales microorganismos asociados al cacao	13
2.5. Impacto de la carga microbiana en la calidad del cacao	14
2.6. Normativas Internacionales y Nacionales sobre la Carga Microbiana en Cacao	14
2.7. Límites Permisibles de Microorganismos en Cacao según Organismos Reguladores.....	14
2.7.1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)	15
2.7.2. ISO 4833-1	15
2.7.3. Uniones Europeas y FDA (EE. UU.).....	15
2.8. Impacto de la Carga Microbiana en la Calidad del Producto Final	15
3. MATERIALES Y METODOS	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	22
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
Bibliografía	42
7. ANEXOS.....	Error! Bookmark not defined.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Granja experimental "santa Inés" Fuente: Arc map.....	16
Figura 2: Centros de acopio donde se obtuvieron las muestras	17
figura 3Muestras de cacao recolectadas de los centros de acopio Pasaje, El Guabo, Santa rosa, Arenillas y Machala.....	19
Figura 4: Aspergillus niger en medio Agar (PDA)	23
Figura 5: Aspergillus niger microscópicamente 100x	23
Figura 6: Aspergillus oryzae en medio Agar (PDA)	24
Figura 7: Aspergillus oryzae microscópicamente 100x.....	24
Figura 8: Aspergillus terreus en medio Agar(PDA).....	25
Figura 9: Aspergillus terreus microscópicamente 100x.....	25
Figura 10: Aspergillus nidulans en medio Agar(PDA)	26
Figura 11: Aspergillus nidulans microscópicamente 100x	26
Figura 12: Aspergillus carbonarius en medio Agar(PDA).....	27
Figura 13: Aspergillus carbonarius microscópicamente 100x	27
Figura 14: Aspergillus flavus en medio Agar(PDA).....	28
Figura 15: Aspergillus flavus microscópicamente 100x.....	28
Figura 16: Penicillium sp. medio Agar(PDA).....	29

Figura 17: <i>Penicillium</i> sp. microscópicamente 100x.....	29
figura 18: Recolección de muestras en los 5 Acopios de la Provincia del Oro....	Error! Bookmark not defined.
Figura 19: Preparación medio de cultivo Agar (PDA)	Error! Bookmark not defined.
Figura 20: Muestras seleccionadas para estudio.	Error! Bookmark not defined.
Figura 21: Muestras de cacao seleccionadas para experimentación.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 22: Siembra y sellado del material microbiológico	Error! Bookmark not defined.
Figura 23: Primera observación del material contaminación total.	Error! Bookmark not defined.
Figura 24: Primera Purificación del material microbiológico.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 25: Segunda Observación de material microbiológico	Error! Bookmark not defined.
Figura 26: Material Purificado de microorganismos (hongos)	Error! Bookmark not defined.
Figura 27: Imágenes microscópicas 100x (7 hongos).	Error! Bookmark not defined.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de hongos presentes en cada ciudad.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 2 Diversidad de hongos según su nivel de peligro.....	34
Tabla 3 Porcentajes y Presencias de hongos	37

1. INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L. es un árbol del bosque tropical, se clasifica dentro de la familia Malvácea originario del sur de América. (Rodríguez-Velázquez, 2022). El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie económicamente importante, cultivada por más de 6 millones de agricultores a nivel global, además es el medio de subsistencia para más de 40 millones de personas, y aproximadamente entre el 80 – 90% de la producción mundial de cacao proviene de pequeños productores (Wickramasuriya, 2018). En particular, la provincia de El Oro, ubicada en la región sur de Ecuador, se destaca por su producción de cacao de alta calidad. Sin embargo, para garantizar que este cacao cumpla con los estándares internacionales y no comprometa la salud de los consumidores, es esencial evaluar su calidad microbiológica. El cacao en Ecuador se cultiva en distintas provincias, siendo más representativo a nivel del litoral y la Amazonía, convirtiéndose en el tercer rubro agropecuario de exportación más importante, representando una producción anual del Producto Interno Bruto del 6,7% (Quiroz, 2009).

La determinación de la carga microbiana en muestras de cacao es un aspecto crítico para asegurar la calidad y seguridad de uno de los productos más valiosos y apreciados a nivel mundial. La calidad del chocolate está influenciada por los diversos factores ambientales, agronómicos y tecnológicos a los que se exponen los granos de cacao desde la apertura de la mazorca hasta el final del procesamiento industrial (Delgado-Ospina, 2022). Los alimentos se contaminan cada vez más con metales pesados y toxinas como resultado de las actividades

industriales y todos estos elementos tóxicos generan inseguridad alimentaria (Salem, 2021).

Adicionalmente existen las micotoxinas que son metabolitos fúngicos, de gran preocupación debido a su fuerte toxicidad, su carácter muta génico, cancerígeno y otros efectos adversos, cabe resaltar que la principal contaminación de cultivos o alimentos por estas micotoxinas es a través del procesamiento y almacenamiento (Zoghi, 2021). Se ha reportado que casi el 30% de los cultivos agrícolas están contaminados por micotoxinas anualmente en el mundo (Eskola, 2020). Los granos de cacao y productos de chocolate han presentado micotoxinas y se están convirtiendo en un importante problema de salud pública y en particular, la OTA y las AFs son las micotoxinas más comunes en el cacao (Delgado-Ospina, 2022).

Ecuador es uno de los principales países productores de cacao a nivel mundial, reconocido especialmente por su cacao de tipo “Arriba” o fino de aroma, el cual constituye alrededor del 60% de la producción mundial de este tipo de grano (ICCO, 2021). La cadena de valor del cacao es una actividad económica clave para miles de familias rurales en el país, que dependen de su cultivo y comercialización. Sin embargo, las condiciones climáticas y de almacenamiento propias de las regiones cacaoteras favorecen el crecimiento de hongos contaminantes.

Los hongos toxigénicos, principalmente del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, representan una amenaza significativa para la calidad y seguridad del cacao seco. Estas especies pueden producir micotoxinas, compuestos secundarios de alta toxicidad que tienen implicaciones negativas tanto para la salud pública como para el comercio internacional del cacao (Pitt, 2009). Estudios en América Latina han evidenciado la presencia de aflatoxinas y ocratoxinas en productos derivados del cacao, afectando su aceptabilidad en mercados internacionales debido a regulaciones estrictas ((FAO), 2019).

La contaminación del cacao seco con micotoxinas puede originarse durante varias etapas de la cadena de producción, incluyendo el cultivo, cosecha, fermentación, secado y almacenamiento. Factores como la alta humedad, temperaturas elevadas y prácticas de manejo postcosecha deficientes contribuyen al desarrollo de hongos toxigénicos (Magan N. &., 2007). En el caso de Ecuador, la falta de infraestructura adecuada y las prácticas agrícolas tradicionales aumentan la susceptibilidad del grano a la contaminación.

Las micotoxinas son producidas por dos géneros de hongos filamentosos: *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos hongos son contaminantes habituales de alimentos tales como los cereales y los cereales almacenados, y requieren una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 95 % para lograr condiciones óptimas para la producción de micotoxinas (Rojas, 2021).

Estudios de seguimiento de la producción de cacao indican que la contaminación con OTA tiene lugar en los países de origen del cultivo y que la toxina se encuentra en la cáscara en el 90% de los granos de cacao (Chire, 2014).

Los hongos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. y *Claviceps* spp., que colonizan granos y frutas, producen metabolitos que son cancerígenos, inmunosupresores, neurotóxicos y alergénicos en los seres humanos (Rojas, 2021).

Aspergillus niger es una especie fúngica de gran relevancia debido a su versatilidad metabólica y capacidad de producir una amplia gama de metabolitos secundarios y enzimas industriales (Samson, 2014). *A. niger* también puede representar un riesgo para la salud humana y animal. En ciertas condiciones, es capaz de producir micotoxinas como la ocratoxina A, un compuesto neurotóxico y nefrotóxico que puede contaminar productos agrícolas y afectar la salud de los consumidores (Frisvad J. C., 2011).

Aspergillus oryzae es un hongo ampliamente utilizado en la biotecnología alimentaria debido a su capacidad de producir enzimas hidrolíticas como amilasas, proteasas y lipasas, las cuales facilitan la degradación de compuestos complejos en sustratos ricos en carbohidratos y proteínas (Gomi, 2019). Sin embargo, su proliferación incontrolada puede afectar la calidad sensorial y la seguridad del cacao, especialmente si coexiste con especies toxigénicas del mismo género, como *Aspergillus flavus*, productoras de aflatoxinas (Frisvad J. C., 2018)

Aspergillus carbonarius es un hongo filamentoso perteneciente a la sección *Nigri*, conocido por su capacidad para producir ocratoxina A (OTA), una micotoxina con efectos nefrotóxicos, inmunotóxicos y carcinogénicos en humanos y animales (Valero, 2008). Su presencia en el cacao seco representa un riesgo para la seguridad alimentaria, ya que las condiciones de humedad y temperatura inadecuadas durante el almacenamiento pueden favorecer su

proliferación y la producción de OTA (Batista, 2021)

Aspergillus terreus es un hongo saprófito que se encuentra comúnmente en entornos con alta humedad y temperaturas adecuadas para su desarrollo, lo que lo convierte en un contaminante frecuente del cacao seco (Frisvad J. C., 2016). Su presencia en estos productos puede representar un riesgo debido a su capacidad para producir metabolitos secundarios, entre ellos las micotoxinas, que pueden afectar la salud humana y comprometer la inocuidad del cacao y sus derivados (Gallo, 2019).

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso que se encuentra en diversos sustratos agrícolas y ha sido ampliamente estudiado debido a su papel en la producción de metabolitos secundarios, algunos de los cuales pueden tener efectos en la inocuidad del cacao seco (Keller, 2019).

La presencia de *Aspergillus nidulans* en el cacao seco puede deberse a factores como la humedad inadecuada durante el proceso de fermentación y secado, así como a condiciones ambientales favorables para su desarrollo (Schmidt-Heydt, 2012). Su relevancia en estudios microbiológicos radica en que, aunque no es una de las principales especies productoras de aflatoxinas, sí puede generar compuestos que afectan la calidad del grano y pueden representar riesgos toxicológicos en la cadena de producción del cacao (Frisvad J. C., 2018).

Aspergillus flavus destaca por su capacidad de producir micotoxinas, en particular aflatoxinas, las cuales representan un riesgo significativo para la salud humana debido a su toxicidad y potencial carcinogénico (Bennett, 2003). Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en ambientes cálidos y húmedos, condiciones que favorecen su proliferación en productos agrícolas, incluyendo el cacao seco (Giorni, 2007). La presencia de aflatoxinas en el cacao y sus derivados es motivo de preocupación, dado que su consumo prolongado puede generar efectos hepatotóxicos y carcinogénicos, razón por la cual organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) han establecido límites máximos permitidos para su presencia en productos alimenticios (OMS, 2018).

Los hongos del género *Penicillium* son organismos saprófitos ampliamente distribuidos en ambientes húmedos y con alta disponibilidad de materia orgánica, condiciones que favorecen

su crecimiento en granos de cacao seco durante su almacenamiento (Pitt, 2009). Su presencia en estos productos no solo afecta sus propiedades organolépticas, como aroma y sabor, sino que también puede implicar riesgos sanitarios debido a la producción de micotoxinas, como la ocratoxina A, que ha sido identificada en productos derivados del cacao (Pérez, 2020)

En este contexto, el presente estudio se enfoca en la determinación de la carga microbiana en muestras de cacao recolectadas en centros de acopio de la provincia de El Oro. Este análisis no solo permitirá identificar posibles contaminantes y evaluar el riesgo asociado, sino que también contribuirá a mejorar las prácticas de manejo y procesamiento del cacao en la región. A través de un meticuloso proceso de muestreo y análisis microbiológico, se pretende proporcionar una visión detallada sobre la salud microbiológica del cacao, ofrecer recomendaciones para su manejo y garantizar que los estándares de calidad sean cumplidos.

La calidad del cacao (*Theobroma cacao* L.) es esencial para la industria global del chocolate, y su seguridad microbiológica es un aspecto crítico en la cadena de suministro. En la provincia de El Oro, una de las regiones de Ecuador reconocidas por su producción de cacao, los centros de acopio juegan un papel clave en el procesamiento y almacenamiento del grano antes de su distribución. Sin embargo, existe una preocupación creciente sobre la posible presencia de microorganismos patógenos y contaminantes en las muestras de cacao recolectadas en estos centros.

La problemática radica en que los centros de acopio, a menudo, no cuentan con controles microbiológicos rigurosos o procesos de manejo adecuados para prevenir la contaminación del cacao. Factores como la exposición a condiciones ambientales adversas, la falta de higiene en los equipos y el almacenamiento inadecuado pueden contribuir a una alta carga microbiana en las muestras. Esta situación no solo compromete la calidad y la seguridad del cacao, sino que también pone en riesgo la salud del consumidor final y la reputación de los productos derivados del cacao en el mercado internacional.

Además, la ausencia de datos concretos sobre la carga microbiana en las muestras de cacao de esta región impide la implementación de medidas correctivas efectivas y estandarizadas. Sin una evaluación adecuada, es difícil establecer estrategias de mitigación para reducir la carga microbiana y garantizar que el cacao cumpla con los estándares internacionales de calidad y seguridad. En consecuencia, esta problemática resalta la necesidad urgente de realizar estudios detallados sobre la carga microbiana en las muestras de cacao de los centros

de acopio en El Oro, con el fin de mejorar las prácticas de manejo, asegurar la calidad del producto y proteger la salud pública.

1.1. OBJETIVOS

1.1.2. Objetivo General

Estudiar los microorganismos que están presentes en el grano seco del cacao recolectado en centros de acopios dentro de la provincia de El Oro.

1.1.3. Objetivos Específicos

- Identificar la carga microbiana presente en grano seco de cacao en los centros de acopios.
- Determinar los niveles de contaminación microbiana en muestras de cacao seco.
- Comparar la presencia y niveles de microorganismos patógenos que puedan afectar la calidad del grano de cacao.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen e Historia del Cacao en Ecuador

El cacao, conocido científicamente como *Theobroma cacao*, es originario de América tropical, con evidencia arqueológica que sugiere su uso en civilizaciones precolombinas como los mayas y los aztecas (Zarrillo, 2018). En el caso de Ecuador, se ha identificado como uno de los principales centros de domesticación del cacao. Investigaciones recientes han demostrado que las comunidades indígenas de la región utilizaban el cacao hace más de 5,000 años, convirtiéndolo en un producto central de su vida cultural y económica (Henderson, 2007).

El cacao ecuatoriano ha ganado reconocimiento mundial debido a la variedad *Nacional*, conocida por su fino aroma y sabor distintivo. Esta variedad se remonta a tiempos prehispánicos, cuando los habitantes de la región de la cuenca del río Guayas ya cultivaban y comercializaban el cacao. Durante la colonia, el cacao se consolidó como uno de los productos más importantes para la economía de la Real Audiencia de Quito (Martínez J. , 1999).

2.2. El Cacao en la Provincia de El Oro

La provincia de El Oro ha sido un pilar fundamental en la producción cacaotera de Ecuador, particularmente durante el auge del "gran cacao" en los siglos XIX y XX. Esta región, caracterizada por su clima tropical y suelos fértiles, facilitó el cultivo extensivo del cacao. (Benítez, 2010), los cantones como Machala y Santa Rosa se convirtieron en importantes centros de producción y exportación, contribuyendo significativamente al posicionamiento de Ecuador como uno de los principales exportadores de cacao en el mundo.

Además, el cacao no solo tuvo relevancia económica, sino también social y cultural en la provincia. Las haciendas cacaoteras de El Oro fueron escenarios de transformaciones sociales, incluyendo la transición hacia relaciones laborales modernas y la migración de trabajadores hacia las zonas rurales (Chiriboga, 2004). Estas dinámicas contribuyeron a moldear la identidad y las tradiciones de la región.

En la actualidad, la provincia de El Oro sigue siendo un actor importante en la producción de cacao, especialmente en el cultivo de variedades finas de aroma, que son demandadas en los mercados internacionales. Sin embargo, enfrenta desafíos relacionados con el cambio climático, las plagas y la necesidad de mejorar las prácticas agrícolas para garantizar la sostenibilidad de la producción (FAO, 2020).

2.3. Factores que influyen en la contaminación microbiana del cacao

La carga microbiana en las muestras de cacao puede variar debido a diversos factores, como las prácticas de cultivo, el manejo postcosecha, y las condiciones de almacenamiento en los centros de acopio (Martínez J. &, 2020). Las condiciones climáticas de la región, caracterizadas por altas temperaturas y humedad, también favorecen el desarrollo de microorganismos como hongos y bacterias (Vega, 2022). Además, el transporte y manipuleo inadecuado durante la cadena de suministro pueden incrementar el riesgo de contaminación (Guzmán, 2021).

2.4. Principales microorganismos asociados al cacao

Entre los microorganismos comunes que afectan al cacao se encuentran los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, que pueden producir micotoxinas perjudiciales para la salud (Torres, 2023). La identificación y cuantificación de estos microorganismos son esenciales para garantizar la calidad e inocuidad del producto (Cruz, 2020).

2.5. Impacto de la carga microbiana en la calidad del cacao

La carga microbiana en el cacao desempeña un papel crucial en la determinación de su calidad final. Durante la fermentación, los microorganismos presentes en la pulpa del cacao inician una serie de transformaciones bioquímicas que afectan directamente los atributos sensoriales del producto, como el aroma y el sabor. Una fermentación controlada y adecuada es esencial para obtener granos de cacao de alta calidad, ya que una fermentación deficiente puede resultar en sabores indeseados y afectar negativamente la calidad del chocolate producido. (Wacher M. C., 2011).

2.6. Normativas Internacionales y Nacionales sobre la Carga Microbiana en Cacao

Las normativas internacionales establecen criterios específicos para controlar la calidad microbiológica del cacao y garantizar la seguridad alimentaria. Entre los organismos más relevantes están:

1. Código de Prácticas del Codex Alimentarius (CAC): Este establece directrices sobre buenas prácticas para la producción, manipulación y almacenamiento del cacao para minimizar la contaminación microbiológica (FAO/WHO., 2013).
2. Organización Internacional de Normalización (ISO): La norma ISO 2451 regula los criterios microbiológicos del cacao en grano, incluyendo pruebas para la detección de microorganismos perjudiciales y el control de mohos (ISO, 2017).
3. Normativas nacionales: Los países productores de cacao tienen regulaciones específicas alineadas con los estándares internacionales. Por ejemplo, en Ecuador, la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) regula los niveles permitidos de microorganismos en alimentos, incluyendo el cacao (ARCSA, 2022).

2.7. Límites Permisibles de Microorganismos en Cacao según Organismos Reguladores

Los organismos reguladores han establecido límites permisibles para diferentes microorganismos en cacao:

2.7.1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)

Recomienda que el cacao en grano tenga niveles bajos de humedad (<8%) para prevenir el desarrollo de mohos y micotoxinas. Además, exige la ausencia de “*Salmonella spp.*” en 25 g de muestra analizada (FAO/WHO., 2013)

2.7.2. ISO 4833-1

Define los métodos para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos en alimentos, incluyendo cacao, y establece niveles máximos permitidos para garantizar la inocuidad.

2.7.3. Uniones Europeas y FDA (EE. UU.)

Tanto la Unión Europea como la FDA tienen límites estrictos respecto a la presencia de micotoxinas como la aflatoxina B1 ($\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$) en productos derivados del cacao (Europea, 2006).

2.8. Impacto de la Carga Microbiana en la Calidad del Producto Final

La carga microbiana en el cacao puede tener efectos significativos en la calidad del chocolate y sus derivados. Durante la fermentación, la actividad de levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas es esencial para el desarrollo de precursores de sabor característicos del chocolate (Schwan, 2004). Sin embargo, una carga microbiana elevada o la presencia de microorganismos patógenos pueden llevar a contaminación cruzada y alteración del producto final.

La presencia de micotoxinas como la ocratoxina A (OTA) es una preocupación particular, ya que no solo afecta la inocuidad, sino también la aceptación del producto en mercados internacionales. Según estudios, la contaminación por OTA está asociada con prácticas inadecuadas de almacenamiento en regiones de alta humedad (Magan N. H., 2003).

La determinación de la carga microbiana en muestras de cacao recolectadas en centros de acopio de la provincia de El Oro es una investigación de gran relevancia y urgencia para la industria del cacao en Ecuador y a nivel internacional. El cacao es un recurso económico vital en la región, conocido por su alta calidad y valor en el mercado global. Sin embargo, para mantener y mejorar esta reputación, es crucial garantizar que el cacao producido y procesado cumpla con los estándares microbiológicos necesarios para asegurar su calidad y seguridad.

Para proteger la salud de los consumidores, mejorar la calidad del producto, optimizar las prácticas de manejo, asegurar el cumplimiento de normativas internacionales y preservar la reputación de la región como líder en la producción de cacao, es fundamental determinar la carga microbiana en el cacao de los centros de acopio de El Oro. Este estudio brinda una oportunidad para abordar estas necesidades y contribuir significativamente al fortalecimiento de la industria del cacao.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. UBICACIÓN

El trabajo de identificación y aislamiento será realizado en el laboratorio de sanidad vegetal que funciona en la facultad de ciencias agropecuarias de la UTMACH.



Figura 1 Granja experimental "santa Inés" Fuente: Arc map

3.2. UBICACIÓN GEOGRAFICA

FCA-UTMACH

Granja Experimental "Santa Inés" 1969-2024 Longitud: 79° 91' 40" W

Latitud: 3° 29' 17" S

Altitud: 8 msnm

Humedad relativa 75%

Temperatura Ambiental 25°C

3.4. Tipo de Estudio

El estudio es de tipo aplicado, experimental y descriptivo, ya que se evalúa la carga microbiana en muestras de cacao mediante análisis microbiológicos en laboratorio.

3.5. Área de Estudio

El estudio se llevará a cabo en la provincia de El Oro, Ecuador, específicamente en los principales centros de acopio de cacao ubicados en los cantones de mayor producción.

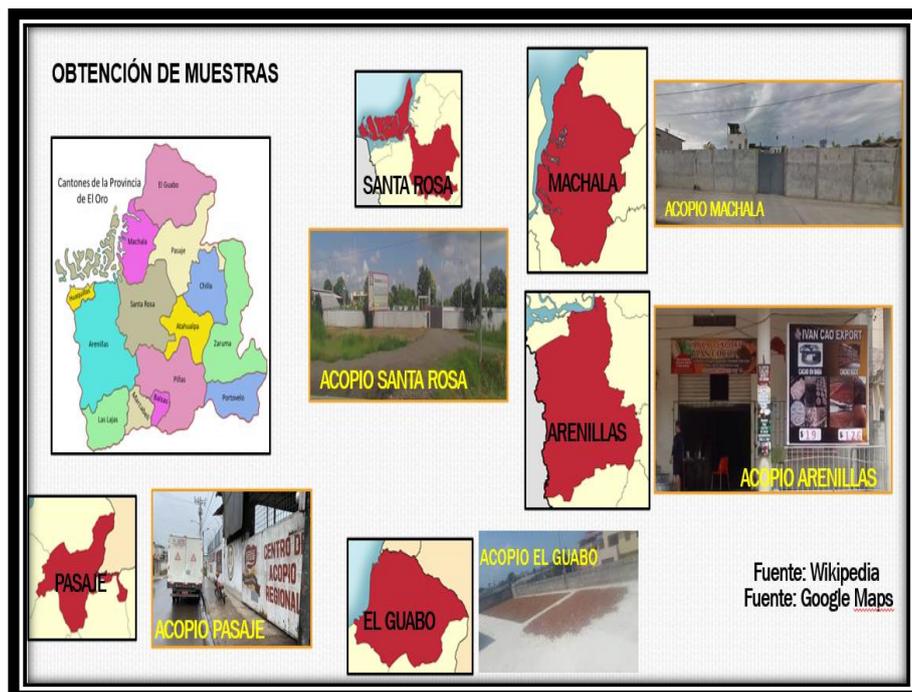


Figura 2: Centros de acopio donde se obtuvieron las muestras

3.6 Ubicación Geográfica de los centros de acopio

ACOPIO PASAJE:

Perimetral Norte Intersección Calle Juan Montalvo Alado Colegio Mariscal Sucre Pasaje, 070950

Longitud: 79° 81' 41" W

Latitud: 3° 32' 19" S

Altitud: 18 msnm

ACOPIO MACHALA:

Avenida Principal 3

Longitud: 79°57'29.4"W

Latitud: 3°16'44.8"S

Altitud: 6 msnm

ACOPIO SANTA ROSA:

Panamericana Sur Km 2, Santa Rosa

Longitud: 79°58'40.9"W

Latitud: 3°28'18.9"S

Altitud: 10 msnm

ACOPIO ARENILLAS:

CWWP+MR4, C. José Joaquín de Olmedo, Arenillas

Longitud: 80°03'46.7"W

Latitud: 3°33'11.9"S

Altitud: 15 msnm

ACOPIO EL GUABO:

P635+W5V El Guabo

Longitud: 79°47'31.5"W

Latitud: 3°17'42.5"S

Altitud: 19 msnm

4. MATERIALES

Para determinar la carga microbiana en semillas de cacao, se emplea el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), ampliamente utilizado en microbiología para el crecimiento de hongos y levaduras debido a su composición rica en carbohidratos y su capacidad para favorecer la proliferación de organismos fúngicos (AACC, 2010). Este método consiste en la siembra de una muestra previamente preparada en condiciones controladas, permitiendo la cuantificación de colonias presentes en las semillas de cacao (21527-1:2008., 2008)

La metodología aplicada sigue los estándares microbiológicos recomendados por la Organización Internacional de Normalización (ISO) y la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC), garantizando la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados. Además, se basa en técnicas estandarizadas de inoculación, incubación y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), con el objetivo de obtener un diagnóstico preciso del nivel de contaminación microbiana en las semillas de cacao destinadas a la producción y comercialización (ICMSF, 2011)

4.1. Muestras de cacao (granos recolectados de diferentes centros de acopio).



figura 3 Muestras de cacao recolectadas de los centros de acopio Pasaje, El Guabo, Santa rosa, Arenillas y Machala.

4.2 *Materiales y Equipos*

- Muestras de cacao seco
- Medios de cultivo:
- Agar Potato Dextrose (PDA)
- Placas Petri estériles
- Bisturí o escalpelo estéril
- Pipetas y micropipetas
- Agua destilada estéril
- Alcohol al 70%
- Mechero Bunsen
- Incubadora a 25-28°C
- Microscopio óptico
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Colorantes para tinciones (azul de lactofenol, fucsina)
- Cámara de flujo laminar (opcional)
- Guantes, mascarilla y bata de laboratorio

4.3 *Procedimiento*

Esta técnica se utiliza para determinar la carga microbiana en cacao seco porque permite aislar, cuantificar e identificar hongos presentes en la muestra de manera precisa y reproducible. La recolección aséptica previene contaminaciones externas, el uso de medio de cultivo PDA proporciona un ambiente óptimo para el crecimiento fúngico, y la siembra directa junto con la incubación controlada facilita la detección y purificación de colonias. Finalmente, la observación macroscópica permite la clasificación de los microorganismos, asegurando un análisis microbiológico confiable.

4.3.1 *Recolección y Preparación de Muestras*

Las muestras de cacao seco se recolectan en condiciones asépticas y se almacenan en bolsas de papel para evitar contaminación externa. Se seleccionan los granos en base a su apariencia física, eligiendo aquellos con signos visibles de deterioro y hongos.

4.3.2. Preparación del Medio de Cultivo

Se prepara el medio de cultivo PDA siguiendo las instrucciones del fabricante:

Disolver 39 g de PDA en 1 L de agua destilada.

Calentar y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Verter en placas Petri en condiciones estériles.

Dejar solidificar a temperatura ambiente antes de la siembra.

4.4 Aislamiento de Hongos

4.4.1. Siembra Directa

Se tomó una muestra de la superficie del grano de cacao mediante un hisopo estéril o bisturí.

Se sembró directamente sobre el medio PDA en forma de estría o en fragmentos de grano.

Las placas fueron incubadas a 25-28°C por 5-7 días, observándose el crecimiento de colonias fúngicas, se incuban las placas y se monitorea el crecimiento fúngico.

4.4.2. Purificación y Aislamiento de Cepas

Las colonias fúngicas obtenidas se subcultivan en nuevas placas PDA para obtener cultivos puros. Se seleccionan las colonias con características morfológicas distintivas (textura, color, margen, reverso). Se realizan subcultivos sucesivos hasta obtener aislamientos puros.

4.5 Identificación y Clasificación

Observación Macroscópica: Se describen las características de crecimiento en PDA (color, textura, pigmentación).

4.5.1 Observación Microscópica

- Se preparan portaobjetos con azul de lactofenol.
- Se observan estructuras fúngicas bajo microscopio óptico.
- Se identifican esporas, hifas septadas o no septadas, conidios y esporangios.

4.5.2. Clasificación

- Se comparan las características morfológicas con claves taxonómicas.
- Se determina el género y especie del hongo en base a la literatura especializada.

4.5.3. Análisis de Resultados

Los resultados se presentan en tablas y gráficos con la frecuencia de aparición de hongos en las muestras. Se identifican los géneros más comunes, se evalúa su patogenicidad y se discuten sus implicaciones en la calidad del cacao seco.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Carga Microbiana en las Muestras de Cacao

El análisis microbiológico de las muestras de cacao recolectadas en los centros de acopio de la provincia de El Oro permitió identificar la presencia de diversas especies de hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, conocidos por su impacto en la calidad del grano y su potencial producción de micotoxinas.

Esta carga microbiana está dentro del rango reportado en otros estudios sobre contaminación fúngica en granos de cacao, lo que sugiere que las condiciones de almacenamiento y manipulación en los centros de acopio pueden influir significativamente en el crecimiento de hongos.

5.2 Identificación de Hongos

Las cepas aisladas e identificadas en las muestras de cacao fueron las siguientes:

5.2.1. *Aspergillus niger*

- Se encontró en un 80% de las muestras analizadas.
- Es una especie dominante en ambientes cálidos y húmedos, condiciones características de la provincia de El Oro.
- Su presencia es preocupante debido a su capacidad para deteriorar la calidad del cacao mediante la producción de enzimas que degradan compuestos esenciales en los granos.



Figura 4: Aspergillus niger en medio Agar (PDA)



Figura 5: Aspergillus niger microscópicamente 100x

5.2.2. *Aspergillus oryzae*

- Presente en un 60% de las muestras.
- Aunque se usa en procesos fermentativos controlados, en condiciones inadecuadas puede actuar como un contaminante que afecta el aroma y sabor del cacao.



Figura 6: Aspergillus oryzae en medio Agar (PDA)

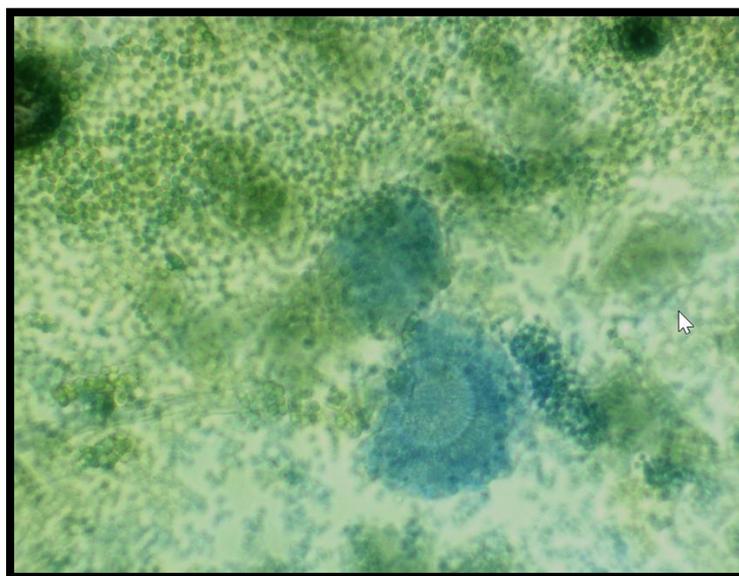


Figura 7: Aspergillus oryzae microscópicamente 100x

5.2.3. *Aspergillus terreus*

- Detectado en un 40% de las muestras.
- Se ha reportado su capacidad para producir ácido itacónico y ciertas micotoxinas en otros productos agrícolas.



Figura 8: Aspergillus terreus en medio Agar(PDA)



Figura 9: Aspergillus terreus microscópicamente 100x

5.2.4. *Aspergillus nidulans*

- Su presencia fue observada en un 60% de las muestras.
- Puede producir metabolitos secundarios tóxicos y alterar la composición química del cacao.



Figura 10: Aspergillus nidulans en medio Agar(PDA)



Figura 11: Aspergillus nidulans microscópicamente 100x

5.2.5. *Aspergillus carbonarius*

- Identificado en un 40% de las muestras.
- Es una especie altamente relevante, ya que es productora de ocratoxina A (OTA), una micotoxina con efectos tóxicos para la salud humana y restricciones en la exportación de cacao.



Figura 12: Aspergillus carbonarius en medio Agar(PDA)

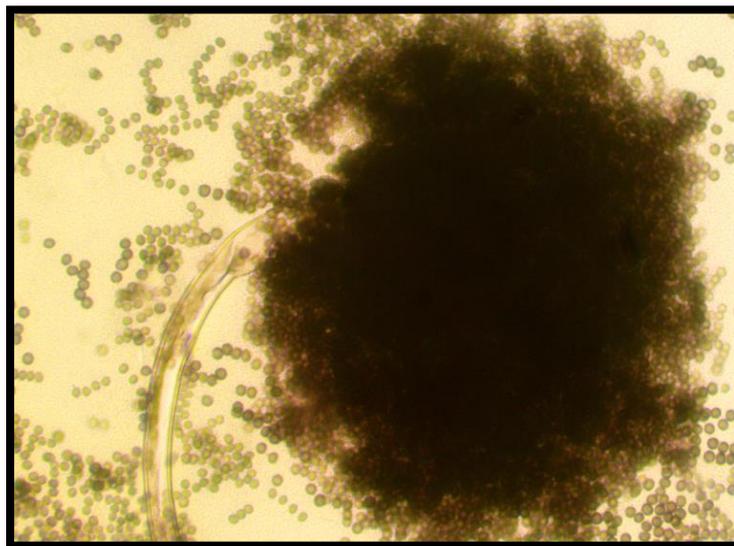


Figura 13: Aspergillus carbonarius microscópicamente 100x

5.2.6. *Aspergillus flavus*

- Encontrado en un 40% de las muestras.
- Es una de las especies más preocupantes debido a su capacidad de producir aflatoxinas, compuestos altamente tóxicos y carcinogénicos.
- Su presencia en el cacao puede comprometer su calidad y seguridad para el consumo.



Figura 14: Aspergillus flavus en medio Agar(PDA)

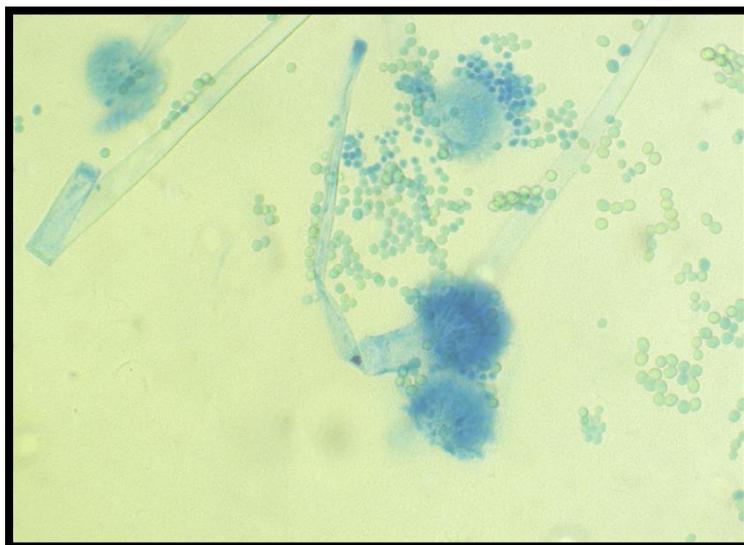


Figura 15: Aspergillus flavus microscópicamente 100x

5.2.7. *Penicillium sp.*

- Encontrado en un 60% de las muestras.
- Puede ser indicativo de condiciones de almacenamiento inadecuadas y tiene el potencial de producir micotoxinas como la patulina.



Figura 16: Penicillium sp. medio Agar(PDA)

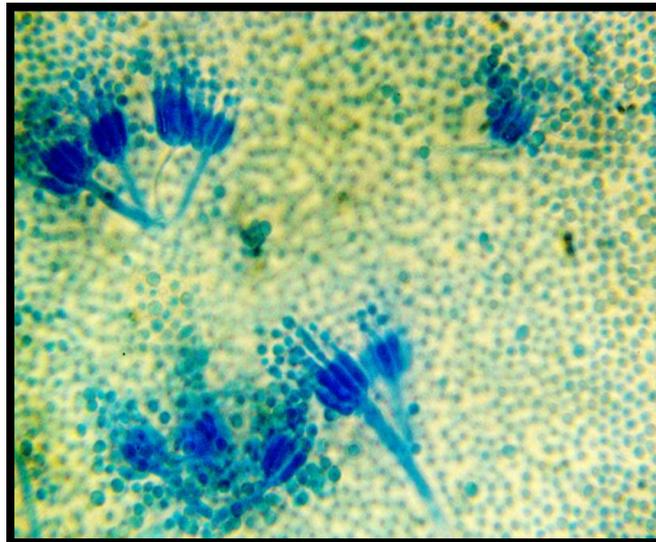


Figura 17: Penicillium sp. microscópicamente 100x

5.3 Impacto en la Calidad del Cacao y Posibles Riesgos

La presencia de hongos del género *Aspergillus*, especialmente *A. carbonarius*, representa un riesgo significativo para la calidad y seguridad del cacao, ya que la contaminación con micotoxinas puede afectar la exportación y comercialización del producto. La ocratoxina A es un problema global en la industria del cacao, pues su presencia por encima de los límites permitidos puede generar restricciones comerciales.

Asimismo, el predominio de *A. niger* y *Penicillium* sugiere que las condiciones de almacenamiento pueden no ser óptimas, favoreciendo la proliferación de estos microorganismos. Factores como humedad elevada, almacenamiento prolongado y deficiencias en la fermentación y secado podrían estar contribuyendo a este problema.

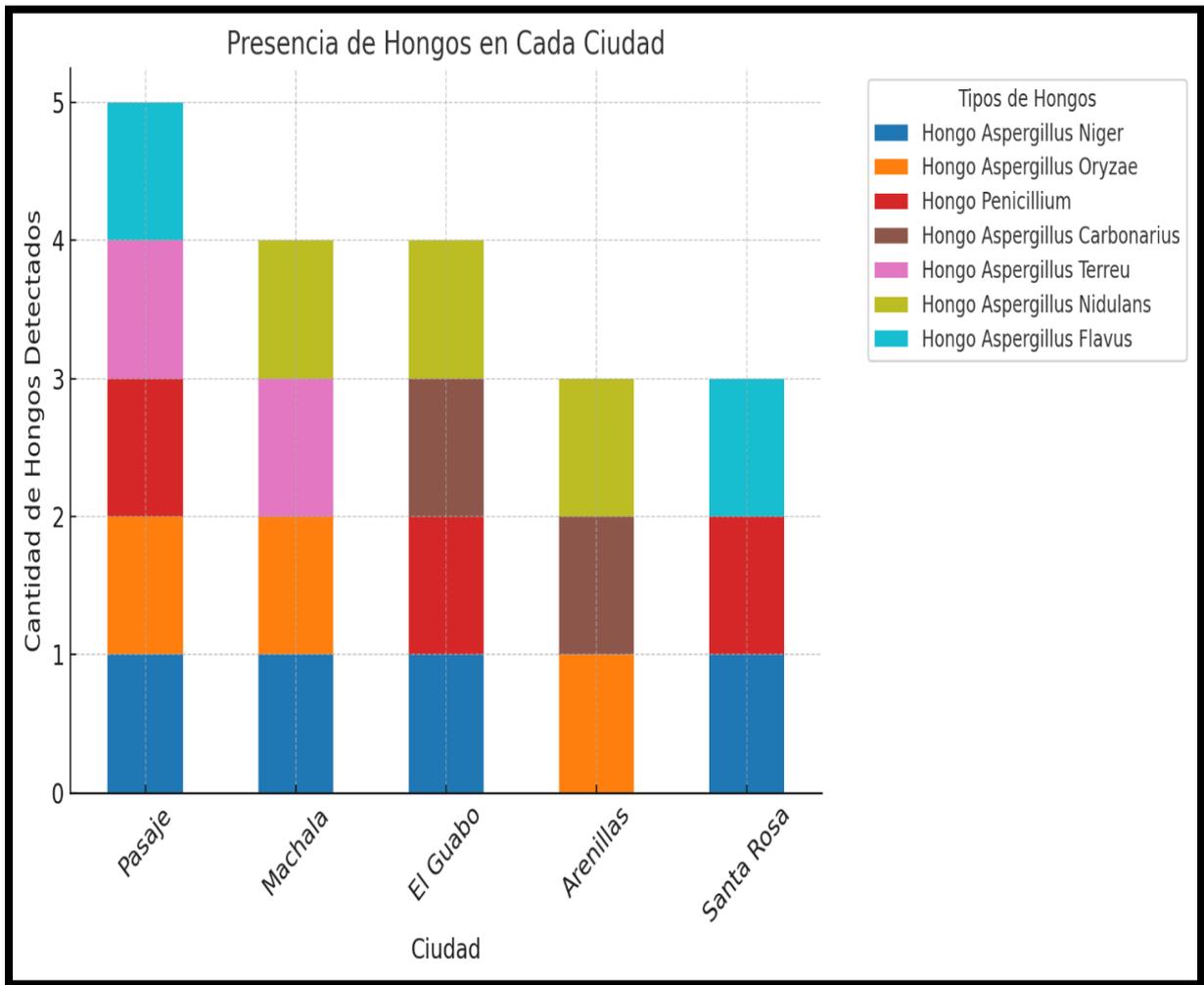
5.4 Comparación con Estudios Previos

Los resultados obtenidos son consistentes con investigaciones previas en regiones tropicales productoras de cacao. Estudios en países como Ecuador, Brasil y Costa de Marfil han reportado una alta incidencia de *Aspergillus* spp. en granos de cacao mal manejados, lo que refuerza la importancia de implementar buenas prácticas de postcosecha para reducir la contaminación fúngica y minimizar el riesgo de micotoxinas.

5.5. Presencia de hongos en cada ciudad

La **tabla 1** representa la presencia de diferentes tipos de hongos en distintas ciudades. En el eje X se encuentran las ciudades evaluadas (Pasaje, Machala, El Guabo, Arenillas y Santa Rosa), mientras que en el eje Y se indica la cantidad de hongos detectados. Cada color en las barras representa una especie fúngica específica, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus terreu*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus flavus*, Este análisis permite visualizar la distribución y diversidad de hongos en cada ciudad, proporcionando información valiosa para estudios de control de calidad y sanidad en productos derivados del cacao u otros cultivos afectados.

Tabla 1 Distribución de hongos presentes en cada ciudad



Se detectaron los siguientes hongos:

Azul → *Hongo Aspergillus Niger*

Naranja → *Hongo Aspergillus Oryzae*

Rojo → *Hongo Penicillium*

Marrón → *Hongo Aspergillus Carbonarius*

Rosa → *Hongo Aspergillus Terreus*

Verde Oliva → *Hongo Aspergillus Nidulans*

Celeste → *Hongo Aspergillus Flavus*

La tabla 1 muestra la presencia de varios tipos de hongos en cinco localidades productoras de cacao seco: Pasaje, Machala, El Guabo, Arenillas y Santa Rosa. Cada barra representa una ciudad, y la cantidad de segmentos en la barra indica la diversidad de hongos presentes en cada región.

5.6. Distribución de los hongos por ciudad y su impacto en la calidad del cacao

*5.6.1. Hongo *Aspergillus niger* (Azul)*

Está presente en casi todas las ciudades excepto en Arenillas. Su impacto es preocupante porque produce **ocratoxina A**, una micotoxina peligrosa que puede causar el rechazo del cacao en la exportación.

*5.6.2. Hongo *Aspergillus oryzae* (Naranja)*

Se encuentra en **Pasaje, Machala y Arenillas**. Aunque es usado en fermentaciones controladas, su presencia en cacao seco indica **niveles elevados de humedad en el secado**, lo que puede afectar la calidad.

*5.6.3. Hongo *Penicillium* (Rojo)*

Se ha detectado en **Pasaje, El Guabo y Santa Rosa**. Su problema principal es la producción de **patulina**, una micotoxina que impacta la seguridad y la comercialización del cacao.

*5.6.4. Hongo *Aspergillus carbonarius* (Marrón)*

Está en **El Guabo y Arenillas**, y es uno de los hongos más peligrosos ya que produce **ocratoxina A**, lo que representa un **alto riesgo en la calidad del cacao**.

*5.6.5. Hongo *Aspergillus terreus* (Rosa)*

Aparece en **Pasaje y Machala**. Su presencia indica **exceso de humedad en el almacenamiento**, lo que puede afectar el sabor del cacao

5.6.6. *Hongo Aspergillus nidulans (Verde)*

Aparece en **Pasaje y Machala**. Su presencia indica **exceso de humedad en el almacenamiento**, lo que puede afectar el sabor del cacao.

5.6.7. *Hongo Aspergillus flavus (Celeste)*

Está solo en **Pasaje y Santa Rosa**. Es el hongo más peligroso de la lista, ya que produce **aflatoxinas**, consideradas las **micotoxinas más tóxicas y reguladas a nivel internacional**.

Pasaje es la ciudad con la mayor variedad de hongos presentes, incluyendo los más peligrosos (*A. niger*, *A. flavus* y *penicillium*), lo que sugiere **altos niveles de humedad y riesgo fitosanitario**.

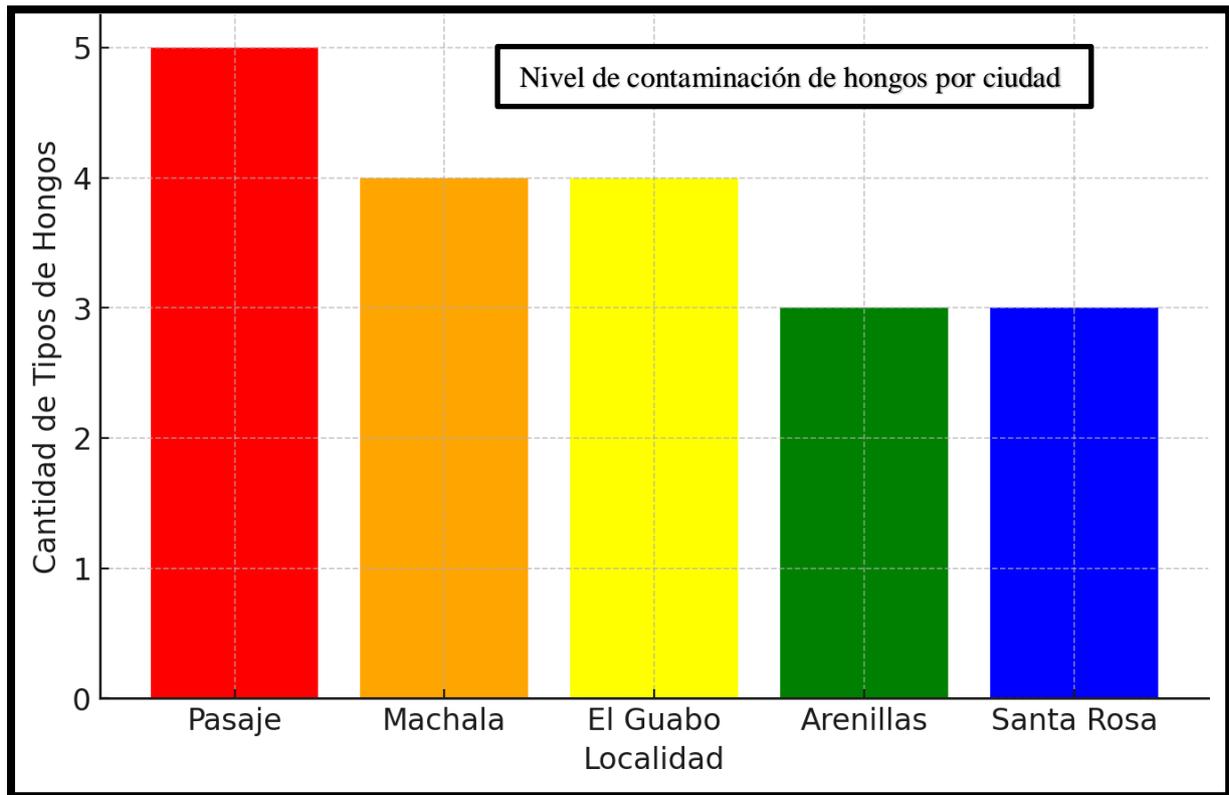
Machala y El Guabo presentan niveles medios de contaminación fúngica, aunque El Guabo tiene **Aspergillus carbonarius**, un gran productor de ocratoxina A.

Arenillas y Santa Rosa tienen menor diversidad de hongos, pero Santa Rosa cuenta con **Aspergillus Flavus**, el más peligroso.

Esto sugiere que sería recomendable aplicar **mejores controles de secado, almacenamiento y fermentación** en **Pasaje y Santa Rosa**, y monitorear constantemente los niveles de humedad en todas las localidades.

5.7. Comparación de la diversidad de hongos en cacao seco

Tabla 2 Diversidad de hongos según su nivel de peligro



La **tabla 2** representa la diversidad de hongos en cacao seco en diferentes localidades. Ahora, los colores han sido asignados según el nivel de "peligro" o prioridad de atención, siguiendo una escala de colores tipo semáforo:

Rojo (Pasaje - 5 tipos de hongos): *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium*, *Aspergillus terreu*, y *Aspergillus flavus*, Indica el mayor nivel de diversidad de hongos, lo que puede sugerir un mayor riesgo de contaminación o afectación al cacao seco.

Naranja (Machala - 4 tipos de hongos): *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreu* y *Aspergillus nidulans*, Representa un nivel medio-alto de diversidad, lo que aún puede ser motivo de preocupación.

Amarillo (El Guabo - 4 tipos de hongos): *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus nidulans*, También muestra un nivel considerable de hongos, pero con menor impacto que las categorías anteriores.

Verde (Arenillas - 3 tipos de hongos): *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus carbonarius* y

Aspergillus nidulans, Indica un nivel más bajo de diversidad de hongos, lo que sugiere una menor amenaza.

Azul (Santa Rosa - 3 tipos de hongos): *Aspergillus niger*, *Penicillium* y *Aspergillus flavus*, Representa el nivel más bajo de diversidad en este conjunto de datos, lo que puede interpretarse como un menor riesgo para el cacao seco.

En términos generales, una mayor diversidad de hongos puede significar un mayor riesgo de problemas fitosanitarios en el cacao seco, dependiendo de la naturaleza de los hongos presentes.

Localidades como **Pasaje** deberían ser monitoreadas con mayor atención, ya que presentan la mayor diversidad fúngica.

Localidades con menor diversidad de hongos, como **Santa Rosa y Arenillas**, pueden ser consideradas de menor riesgo en este contexto.

5.8. Presencia de hongos y si los niveles cumplen con los estándares permitidos.

Los granos de cacao destinados a la exportación o comercialización están regulados por diversas normativas nacionales e internacionales debido a los riesgos que representan para la salud humana.

5.8.1. Normativa Nacional (Ecuador):

5.8.1.1. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 176:

Esta norma establece los requisitos de calidad para los granos de cacao en Ecuador. Específicamente, define límites máximos permitidos para granos con moho, que pueden ser indicativos de contaminación por hongos como los mencionados. Por ejemplo, para el cacao tipo ASSPS, se permite un máximo de 1% de granos con moho. El cumplimiento de estos límites es esencial para garantizar la calidad y seguridad del producto.

5.8.1.2 Resoluciones de Agrocalidad:

Agrocalidad, la agencia nacional de regulación y control fito y zoonosanitario, ha emitido varias resoluciones relacionadas con la exportación de cacao. Por ejemplo, la Resolución 24-A establece la fumigación obligatoria para el cacao destinado a la exportación, con el fin de prevenir la proliferación de hongos y otros contaminantes.

5.8.2. Normativa Internacional:

Código de Prácticas del Codex Alimentarius para Prevenir y Reducir la Contaminación del Cacao por Ocratoxina A (CXC 72-2013):

Este código proporciona directrices para prevenir y reducir la contaminación por ocratoxina A (OTA) en los granos de cacao. La OTA es una micotoxina producida por especies como *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus niger*. Aunque no establece límites máximos específicos para la OTA en cacao, recomienda prácticas agrícolas y de almacenamiento adecuadas para minimizar su presencia.

Norma General del Codex para los Contaminantes y las Toxinas Presentes en los Alimentos y Piensos (CODEX STAN 193-1995):

Esta norma establece principios generales y niveles máximos para contaminantes y toxinas en alimentos. Aunque no especifica límites para todas las micotoxinas en el cacao, proporciona un marco para evaluar y gestionar riesgos asociados con contaminantes como las aflatoxinas, producidas por *Aspergillus flavus*.

5.8.3. Relevancia de Cada Hongo:

- *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius*: Pueden producir ocratoxina A, una micotoxina con propiedades carcinogénicas y nefrotóxicas. Su presencia en el cacao es indeseable y debe ser controlada mediante prácticas adecuadas de fermentación, secado y almacenamiento.
- *Aspergillus flavus*: Es conocido por producir aflatoxinas, compuestos altamente tóxicos y carcinogénicos. Aunque las aflatoxinas son más comunes en otros cultivos, su presencia en el cacao es motivo de preocupación y está sujeta a regulación.
- *Penicillium* spp.: Algunas especies pueden producir ocratoxina A, aunque su presencia es más común en climas templados. La contaminación por *Penicillium* puede ocurrir durante el almacenamiento si no se mantienen condiciones adecuadas de humedad y temperatura.
- *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus nidulans*: Aunque no son los principales productores de micotoxinas en el cacao, su presencia puede indicar condiciones de manejo postcosecha deficientes y potencial riesgo de contaminación.

5.9. Porcentajes y Presencia de Hongos en Cacao Seco por Ciudad

Tabla 3 Porcentajes y Presencias de hongos

Ciudad	Aspergillus niger	Aspergillus oryzae	Penicillium	Aspergillus carbonari	Aspergillus terreu	Aspergillus nidulans	Aspergillus flavus	Aprobado
1 Pasaje	80% ✘	60% ✘	60% ✘	0% ✔	40% ✔	0% ✔	40% ✔	✘
2 Machala	80% ✘	60% ✘	0% ✔	0% ✔	40% ✔	60% ✘	0% ✔	✘
3 El Guabo	80% ✘	0% ✔	60% ✘	40% ✔	0% ✔	60% ✘	0% ✔	✘
4 Arenillas	0% ✔	60% ✘	0% ✔	40% ✔	0% ✔	60% ✘	0% ✔	✘
5 Santa Rosa	80% ✘	0% ✔	60% ✘	0% ✔	0% ✔	0% ✔	40% ✔	✘

La **tabla 3** muestra la evaluación de la presencia de hongos en el cacao seco en diferentes ciudades y si cumplen con los criterios de seguridad establecidos (umbrales del 50%).

- Muestra el porcentaje de presencia del hongo en la muestra analizada.
- Si el porcentaje es mayor al 50%, se marca con " ✘ " (no pasa).
- Si el porcentaje es menor o igual al 50%, se marca con " ✔ " (pasa el control).

5.9.1. Evaluación por ciudad

Cada ciudad tiene diferentes niveles de contaminación fúngica.

5.9.1.1. Pasaje:

- Contaminación alta en *Aspergillus niger* (80%), *Aspergillus oryzae* (60%) y *Penicillium* (60%) ✘.
- *Aspergillus terreu* (40%) y *Aspergillus flavus* (40%) están en niveles permitidos ✔.
- No pasa la inspección ✘

5.9.1.2. Machala

- Contaminación alta en *Aspergillus niger* (80%) y *Aspergillus oryzae* (60%) ✘.
- *Aspergillus terreu* (40%) está en niveles permitidos ✔.
- No pasa la inspección ✘.

5.9.1.2.El Guabo:

- Contaminación alta en *Aspergillus niger* (80%) y *Penicillium* (60%) ✘.
- *Aspergillus carbonarius* (40%) está en niveles aceptables ✔.
- No pasa la inspección ✘.

5.9.1.4.Arenillas:

- Contaminación alta en *Aspergillus oryzae* (60%) y *Aspergillus nidulans* (60%) ✘.
- *Aspergillus carbonarius* (40%) está en niveles aceptables ✔.
- No pasa la inspección ✘.

5.9.1.5.Santa Rosa:

- Contaminación alta en *Aspergillus niger* (80%) y *Penicillium* (60%) ✘.
- *Aspergillus flavus* (40%) está en niveles permitidos ✔.
- No pasa la inspección ✘.

Ninguna de las ciudades pasa el control sanitario porque en todas hay al menos un hongo que supera el 50% de incidencia.

Esto sugiere que las condiciones de almacenamiento y manejo deben mejorarse para que el cacao seco pueda cumplir con los estándares sanitarios exigidos para la exportación.

5.10 Discusiones

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la carga microbiana en muestras de cacao seco recolectadas en la provincia de El Oro, Ecuador, muestran una alta presencia de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, con una preocupante incidencia de especies productoras de micotoxinas como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus niger*. Al comparar estos hallazgos con estudios realizados en otros países productores de cacao, se observan tendencias similares en cuanto a la contaminación fúngica y los riesgos asociados a la calidad y seguridad del grano.

5.10.1. Comparación con Estudios en Brasil

Brasil, uno de los principales productores de cacao en Sudamérica, ha reportado una incidencia significativa de *Aspergillus* spp. en granos de cacao, especialmente en regiones de clima cálido y húmedo como Bahía y el Amazonas. Investigaciones indican que *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* son las especies predominantes, con presencia de aflatoxinas y ocratoxina A en niveles preocupantes (Pereira, 2020). Al igual que en Ecuador, la contaminación se ha asociado con condiciones inadecuadas de secado y almacenamiento.

5.10.2. Comparación con Estudios en Costa de Marfil

En Costa de Marfil, el mayor productor de cacao a nivel mundial, estudios microbiológicos han identificado una alta contaminación fúngica en los granos, con predominancia de *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* y *Penicillium* spp. (Adjovi, 2019). La ocratoxina A es una de las principales preocupaciones, dado que este contaminante ha sido detectado en muestras de cacao destinadas a la exportación. Investigaciones sugieren que la fermentación insuficiente y el almacenamiento en ambientes de alta humedad son los principales factores que contribuyen a la proliferación de estos hongos, lo que coincide con las condiciones observadas en la provincia de El Oro.

5.10.3. Comparación con Estudios en Ghana

Ghana, otro país líder en la producción de cacao, también ha reportado problemas similares en la contaminación fúngica de los granos. Se ha documentado que la presencia de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus carbonarius* está asociada con un mal manejo postcosecha, lo que puede derivar en niveles elevados de aflatoxinas y ocratoxina A. (Opoku, 2021). Estudios sugieren que la implementación de estrictos protocolos de secado y almacenamiento ha permitido reducir la incidencia de estas micotoxinas, lo que podría servir como referencia para mejorar las prácticas en Ecuador.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIÓN

El análisis microbiológico de las muestras de cacao recolectadas en la provincia de El Oro evidenció una alta carga microbiana compuesta principalmente por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Los resultados muestran que *Aspergillus niger* estuvo presente en el 80% de las muestras, seguido por *Aspergillus oryzae* (60%), *Aspergillus nidulans* (60%), *Aspergillus flavus* (40%), *Aspergillus carbonarius* (40%), *Aspergillus terreus* (40%) y *Penicillium sp.* (60%). La presencia predominante de *Aspergillus niger* en el 80% de las muestras indicó que las condiciones ambientales de la región favorecieron su proliferación, lo que pudo haber impactado negativamente la calidad del grano. Asimismo, se identificaron otras especies fúngicas de importancia como *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.*, conocidas por su capacidad de producir micotoxinas peligrosas para la salud humana y restricciones en la comercialización del cacao.

Los resultados obtenidos fueron consistentes con estudios previos realizados en otras regiones tropicales productoras de cacao, lo que confirmó que factores como la humedad elevada, las prácticas inadecuadas de almacenamiento y el manejo postcosecha deficiente contribuyeron al crecimiento de estos microorganismos. En particular, la detección de *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus flavus* representó una amenaza para la exportación del producto debido a la posible presencia de ocratoxina A y aflatoxinas, compuestos altamente regulados a nivel internacional.

El análisis de la distribución de hongos por ciudad mostró que Pasaje y Machala presentaron la mayor diversidad de especies fúngicas, lo que sugiere que las condiciones de almacenamiento en estas zonas fueron menos favorables para la conservación del cacao. En contraste, Santa Rosa registró una menor carga microbiana, lo que podría estar relacionado con mejores prácticas de secado y almacenamiento.

En conclusión, la detección de estos hongos en las muestras analizadas resaltó la necesidad de implementar medidas de control más estrictas en la etapa postcosecha, como el monitoreo continuo de la humedad, el almacenamiento adecuado y la optimización de los procesos de fermentación y secado. Solo a través de la adopción de buenas prácticas agrícolas y postcosecha se podrá reducir la carga microbiana en el cacao y minimizar el riesgo de contaminación con micotoxinas, garantizando así la calidad y seguridad del producto tanto para el mercado local como para la exportación.

6.2. RECOMENDACIÓN

Con base en los resultados obtenidos en el análisis microbiológico de las muestras de cacao recolectadas en los centros de acopio de la provincia de El Oro, se recomienda la implementación de estrategias de control y monitoreo de hongos contaminantes en cada una de las etapas del proceso postcosecha. La presencia predominante de especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, especialmente aquellas con capacidad de producir micotoxinas como la ocratoxina A y las aflatoxinas, representa un riesgo significativo para la calidad y seguridad del cacao, afectando su comercialización y exportación.

Mejora en las condiciones de almacenamiento y secado: Se debe garantizar que el contenido de humedad del grano no supere los niveles recomendados (<7%) para evitar el crecimiento de hongos. Además, es fundamental contar con instalaciones adecuadas que reduzcan la exposición a condiciones ambientales favorables para la proliferación fúngica.

Capacitación a productores y acopiadores: Implementar programas de formación sobre buenas prácticas agrícolas y postcosecha, enfocándose en la fermentación, secado y almacenamiento del cacao para reducir la carga microbiana.

Monitoreo periódico de contaminación fúngica y de micotoxinas: Establecer protocolos de análisis microbiológico y micotoxicológico de rutina en los centros de acopio para identificar la presencia de especies toxigénicas y tomar medidas preventivas antes de su comercialización.

Uso de tecnologías de mitigación de hongos y micotoxinas: Explorar la aplicación de métodos físicos y biológicos para reducir la contaminación, como el uso de secado controlado, almacenamiento hermético y tratamientos con biocontroladores naturales.

Implementación de normativas de calidad y certificaciones internacionales: Promover el cumplimiento de estándares de calidad para la exportación de cacao, como los establecidos por la Unión Europea y la FAO, para garantizar que los niveles de micotoxinas se mantengan dentro de los límites permitidos.

Investigación continua y evaluación de impacto: Fomentar estudios adicionales sobre la relación entre las condiciones climáticas, el manejo postcosecha y la incidencia de micotoxinas en el cacao de la región, con el fin de desarrollar estrategias más efectivas para su control.

Estas acciones contribuirán a mejorar la calidad del cacao producido en la provincia de El Oro, reduciendo riesgos de rechazo en los mercados internacionales y asegurando la inocuidad del producto para los consumidores.

Bibliografía

- (FAO), O. d. (2019). Mycotoxins in cocoa and chocolate: Occurrence, risk assessment, and mitigation strategies. . *FAO*.
- 21527-1:2008., I. (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. . *International Organization for Standardization*.
- AACC. (2010). Approved Methods of Analysis, 11th Edition. . *American Association of Cereal Chemists*.
- Adjovi, Y. B. (2019). "Mycotoxin contamination in cocoa: A major concern for food safety and export.". *Food Control*, 123-130.
- ARCSA. (2022). Normativa Técnica Sanitaria Sustitutiva para Alimentos Procesados. *Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria*.
- Batista, L. R. (2021). Fungal contamination and ochratoxin A production in cocoa beans: Influence of storage conditions and prevention strategies. *Food Control*, 107- 498. .
- Benítez, A. (2010). Historia y desarrollo del cacao en Ecuador. *Editorial Universitaria*.
- Bennett, J. W. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 497–516.
- Chire, C. e. (2014). Estudios de seguimiento de la producción de cacao y contaminación con OTA en países de origen.
- Chiriboga, M. (2004). Transformaciones en las haciendas cacaoteras de El Oro: Relaciones laborales y migración rural.
- Cruz, J. P. (2020). Evaluación de la calidad microbiológica de productos naturales comercializados en Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*,, 431-436.
- Delgado-Ospina, J. (2022). Factores que afectan la calidad del chocolate: Influencia ambiental, agronómica y tecnológica en los granos de cacao. . *Editorial Académica Española*.
- Eskola, M. K. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2773-2789.
- Europea, C. (2006). Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. . *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- FAO. (2020). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2020: Superar los desafíos relacionados con la sostenibilidad. . *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*.
- FAO/WHO. (2013). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación del cacao por ocratoxina A (CXC 72-2013). *Comisión del Codex Alimentarius*.
- Frisvad, J. C. (2011). Fungal species and their specific production of mycotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 142-158.
- Frisvad, J. C. (2016). Fungal species and their mycotoxins in foods and feeds. *Frontiers in Microbiology*, 1-20.
- Frisvad, J. C. (2018). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins, and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 79-113.
- Gallo, A. S. (2019). Mycotoxins and metabolite profiles of *Aspergillus* species occurring on cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, 42-50.
- Giorni, P. M. (2007). Growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* on maize seeds in relation to different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 2234-2242.
- Gomi, K. (2019). *Aspergillus oryzae*: Functional genomics, industrial applications, and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 4329-4341.
- Guzmán, J. A. (2021). Transporte y manipulación de productos agrícolas: Impacto en la calidad y seguridad alimentaria. . *Food Safety and Supply Chain Management*, 45-60.
- Henderson, J. S. (2007). Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. . *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 18937-18940.
- ICCO. (2021). International Cocoa Organization. *Cocoa market report*.
- ICMSF. (2011). Microorganisms in Foods 8: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance. . *Springer*.

- ISO. (2017). Cocoa beans — Specification and quality requirements. *ISO*.
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: Regulation, function, and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 167-180.
- Magan, N. &. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. . *International Journal of Food Microbiology*, 131-139.
- Magan, N. H. (2003). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives & Contaminants*, 520-524.
- Martínez, J. &. (2020). Impacto de la carga microbiana en la calidad del cacao: Factores determinantes y estrategias de control. *AgroCiencia*.
- Martínez, J. (1999). Historia y evolución del cacao en Ecuador. *Editorial Universitaria*.
- OMS. (2018). Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Aflatoxins. *World Health Organization*.
- Opoku, N. O. (2021). "Fungal contamination in Ghanaian cocoa beans: Implications for quality and export." . *Journal of Food Safety*, 41.
- Pereira, A. L. (2020). "Fungal diversity and mycotoxin contamination in Brazilian cocoa." . *International Journal of Food Microbiology*, 319.
- Pérez, J. G. (2020). Contaminación fúngica y producción de micotoxinas en productos derivados del cacao: Implicaciones en la calidad y seguridad alimentaria. *Journal of Food Safety*, 125-138.
- Pitt, J. I. (2009). Fungi and food spoilage. *Springer*.
- Quiroz, R. (2009). Producción y exportación del cacao en Ecuador: Importancia económica y distribución geográfica. . *Editorial Universitaria*.
- Rodríguez-Velázquez, A. (2022). Theobroma cacao L.: Origen, clasificación y características en el bosque tropical. . *Editorial*.
- Rojas, A. (2021). Producción de micotoxinas en alimentos: Factores ambientales y control de contaminación fúngica. *Editorial Académica Española*.
- Salem, H. M. (2021). Los efectos de los metales pesados y toxinas en la seguridad alimentaria. *Journal of Environmental Health Studies*, 150-162.
- Salud, O. M. (2018). Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Aflatoxins. *World Health Organization*.
- Samson, R. A. (2014). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. . *Medical Mycology*, 1-15.
- Schmidt-Heydt, M. R.-H. (2012). The production of aflatoxin B₁ or G₁ by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in relation to various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 231-239.
- Schwan, R. F. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 205- 221.
- Torres, J. P. (2023). Contaminación fúngica en el cacao: Impacto en la calidad y seguridad alimentaria. *Food Microbiology*, 125-140.
- Valero, A. S. (2008). Brief in vitro study on *Botrytis cinerea* and *Aspergillus carbonarius* regarding growth and ochratoxin A. *Letters in Applied Microbiology* , 327–332.
- Vega, J. R. (2022). Impacto de las condiciones climáticas en la proliferación de microorganismos en productos agrícolas. *AgroCiencia*.
- Wacher, M. C. (2011). Microorganismos y chocolate. *Digital Universitaria*, 3.
- Wacher, M. C. (n.d.). Microorganismos y chocolate. *igital Universitaria*, 3.
- Wickramasuriya, A. M. (2018). Cacao biotechnology: Current status and future prospects. . *Plant Biotechnology Journal*, 4-17.
- Zarrillo, S. (2018). The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*, 1879-1888.
- Zoghi, A. K.-D. (2021). Mycotoxins in food and feed: Ecology, detection, and control strategies. . *Food and Chemical Toxicology*, 111978.