

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ingeniería

DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA

Manejo de moniliasis en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.)
mediante un recubrimiento fungicida y el efecto en sus
características fisicoquímicas

TESIS

Que como parte de los requisitos que para obtener el grado de:

DOCTOR EN INGENIERÍA EN BIOSISTEMAS

P R E S E N T A:

MDI. CRISTIAN JOSUÉ MENDOZA MENESES

DIRIGIDA POR:

DRA. ANA ANGÉLICA FERREGRINO PÉREZ

CO-DIRIGIDA POR:

DRA. MARCELA GAYTÁN MARTÍNEZ

Santiago de Querétaro, noviembre 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Manejo de moniliasis en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante un recubrimiento fungicida y el efecto en sus características fisicoquímicas

por

Cristian Josué Mendoza Meneses

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGDCC-230444



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería en Biosistemas

Manejo de moniliasis en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante un recubrimiento fungicida y el efecto en sus características fisicoquímicas

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ingeniería en Biosistemas

Presenta:

Cristian Josué Mendoza Meneses

Dirigido por:

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Co-dirigido por:

Dra. Marcela Gaytán Martínez

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Presidente

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Secretario

Dr. Juan Fernando García Trejo
Vocal

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Suplente

Dra. Rosario Guzmán Cruz
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
15 de noviembre de 2023
México

DEDICATORIAS

Con todo mi cariño le dedico este trabajo a las personas
más importantes en mi vida.

A mi esposa Karen por el apoyo y las palabras de aliento
para seguir adelante.

A mi familia por siempre estar conmigo a cada paso
personal y profesional.

Especialmente, a mi papá.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente, a DIOS por permitirme llegar hasta este momento de mi vida.

A toda mi familia por el apoyo e interés en mi trabajo de tesis.

Especialmente, a mi esposa Karen por estar conmigo a cada momento y alentarme a seguir con este trabajo ante cualquier adversidad que se presentó.

A la Dra. Angélica Feregrino por darle dirección a este trabajo, enfocar cada idea para realizarla correctamente, también, agradezco a mi sínodo la Dra. Marcela Gaytán, Dr. Fernando García, Dr. Ramón Guevara y Dra. Rosario Guzmán por toda su colaboración en la realización de este proyecto.

A CONAHCYT por el financiamiento en la beca 796218, que permitió el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo en la utilización de recursos, equipo y espacios en los diferentes campus.

Finalmente, agradezco a todas las personas que hicieron posible el desarrollo de este trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Generalidades del cacao	3
2.1.1. Fisiología del árbol de cacao.....	3
2.1.2. Factores en el cultivo del árbol de cacao	5
2.2. Procesamiento de las semillas de cacao	8
2.3. Importancia comercial del cacao y productos derivados en el mundo	10
2.4. Las enfermedades del cacao	12
2.4.1. Moniliasis en el árbol de cacao	15
2.5. Control biológico	16
2.6. Uso de <i>Trichoderma spp.</i> como agente de control biológico	18
2.7. Recubrimientos comestibles	20
2.7.1. Materiales empleados en recubrimientos comestibles.....	21
2.8. Uso de recubrimientos comestibles con agentes de control biológico	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL.....	24
4.1. Objetivos Particulares	24
5. METODOLOGÍA.....	25
5.1. Material biológico, lugar del estudio y diseño experimental	25
5.2. Métodos.....	26
5.2.1. Prácticas culturales precosecha: Poda y aclareo	27
5.2.2. Calidad del suelo.....	27
5.2.3. Elaboración de suspensión de alginato de sodio y solución reticulante.....	27

5.2.4. Incorporación de agente de control biológico en las suspensiones de alginato de sodio	28
5.2.5. Viscosidad de los recubrimientos	29
5.2.6. Espesor y morfología de los recubrimientos	29
5.2.7. Permeabilidad al vapor de agua de los recubrimientos	29
5.2.8. Retención de agua en los recubrimientos	29
5.2.9. Superficie de los recubrimientos comestibles	30
5.2.10. Propiedades mecánicas de los recubrimientos	30
5.2.11. Aplicación del recubrimiento orgánico con el agente de control biológico	30
5.2.12. Identificación taxonómica de <i>Moniliophthora roreri</i> en mazorcas de cacao.....	31
5.2.13. Identificación molecular de <i>Moniliophthora roreri</i>	31
5.2.14. Efecto del agente de control biológico sobre el fitopatógeno	32
5.2.15. Caracterización física de las mazorcas de cacao	33
5.2.16. Determinación del rendimiento de las mazorcas.....	34
5.2.17. Caracterización química de las mazorcas de cacao	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
6.1. Prácticas culturales precosecha	35
6.2. Calidad del suelo	36
6.3. Viscosidad de los recubrimientos	38
6.4. Espesor y morfología del poro de los recubrimientos	39
6.5. Permeabilidad al vapor de agua	41
6.6. Retención de agua en los recubrimientos.....	42
6.7. Superficie de los recubrimientos.....	43
6.8. Propiedades mecánicas de los recubrimientos.....	45

6.9. Aplicación del recubrimiento en condiciones ambientales	48
6.10. Cultivo e identificación taxonómica de <i>Moniliophthora roreri</i>	49
6.11. Identificación por PCR de <i>Moniliophthora roreri</i>	50
6.12. Efecto del agente de control biológico sobre <i>Moniliophthora roreri</i>	51
6.13. Caracterización física de las mazorcas de cacao	53
6.14. Rendimiento de las mazorcas de cacao	54
6.15. Caracterización química de las mazorcas de cacao	56
7. CONCLUSIONES.....	60
8. REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales compañías productoras de chocolates en el mundo en 2020.	11
Tabla 2. Enfermedades causadas por hongos que afectan diferentes partes del árbol de cacao.....	13
Tabla 3. Tipo de mecanismos de obtención de películas y recubrimientos.....	20
Tabla 4. Materiales empleados como recubrimientos comestibles	21
Tabla 5. Estudios de microorganismos empleados en el control biológico de agentes dañinos en plantas.	22
Tabla 6. Composición de los recubrimientos a partir de alginato de sodio y glicerol.	28
Tabla 7. Reactivos utilizados para la prueba PCR.	31
Tabla 8. Valores de referencia y contenido del suelo antes y después de la fertilización.	36
Tabla 9. Evaluación de las propiedades físicas y mecánicas de recubrimientos. .	47
Tabla 10. Propiedades físicas y rendimiento de las mazorcas de cacao de cada zona establecida.	55
Tabla 11. Compuestos químicos de las mazorcas de cacao.....	57
Tabla 12. Perfil de ácidos grasos presentes en las mazorcas de cacao.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología y coloración de las variedades del fruto de cacao.	3
Figura 2. Fisiología del árbol de cacao de acuerdo los frutos, flores y forma de la copa.	4
Figura 3. Diseño de un agroecosistema para el árbol de cacao con plantas madre y fijadoras de nutrientes.	7
Figura 4. Procesamiento tradicional de las semillas para obtener una pasta de cacao.	9
Figura 5. Aplicación de diferentes tipos de poda al árbol de cacao.	36
Figura 6. Análisis de la viscosidad de suspensiones de alginato y glicerol en diferentes proporciones.	38
Figura 7. Morfología del poro de los recubrimientos a base de alginato de sodio y glicerol.	40
Figura 8. Contenido de humedad de los recubrimientos comestibles con glicerol a 84% de humedad relativa.	43
Figura 9. Imágenes SEM de los recubrimientos comestibles con diferentes adiciones de glicerol.	44
Figura 10. Aplicaciones del recubrimiento en condiciones ambientales.	49
Figura 11. Cultivo e identificación de <i>Moniliophthora roreri</i>	49
Figura 12. Identificación por fichas taxonómicas en microscopía óptica a 40X.	50
Figura 13. Amplificación por PCR de cepas de <i>Moniliophthora roreri</i>	51
Figura 14. Confrontación antagónica entre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Moniliophthora roreri</i> a nivel laboratorio.	52
Figura 15. Aumento de rendimiento y consolidación de frutos en las dos etapas de fructificación.	56

RESUMEN

El cacao es un fruto de gran importancia económica alrededor del mundo, sin embargo, su cultivo requiere condiciones específicas del ambiente como clima cálido, alta humedad en el ambiente, exposición media a la luz solar, además, necesita alto contenido en nutrientes del suelo. Estas condiciones favorecen el crecimiento de microorganismos patógenos que dañan la integridad de los frutos e incluso pueden afectar al árbol en general. El hongo *Moniliophthora roreri* es el patógeno causante de moniliasis, la cual, es una de las principales enfermedades del cacao que afecta la productividad mundial. Los agentes de control biológico son una alternativa para combatir diferentes patógenos en los frutos de cacao, estos controles poseen diferentes mecanismos de acción para lograr el manejo de los efectos perjudiciales. No obstante, los agentes de control biológico son afectados por diferentes factores como concentración, medio de aplicación o factores genéticos. Por lo tanto, la utilización de un recubrimiento a base de alginato como medio de contención del agente de control minimiza la influencia de los factores que alteran su efectividad. El efecto antagónico se presenta como la inhibición de crecimiento del micelio del hongo patógeno, detener este crecimiento implica evitar el desarrollo de la moniliasis en el fruto y, por consiguiente, afectar las características fisicoquímicas de los frutos. Estas características o atributos se relacionan con la calidad del fruto y son susceptibles a cambios. Además, son los principales indicadores de la maduración del cacao y permiten comenzar con el proceso de cosecha, sin embargo, estas características dependen de factores propios de la especie y aspectos ambientales. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es determinar el control de un recubrimiento con un agente de control biológico que minimice el desarrollo de moniliasis en frutos de cacao y permita conservar las características fisicoquímicas de las diferentes partes del fruto.

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, *Trichoderma harzianum*, control biológico, técnicas precosecha, características fisicoquímicas.

ABSTRACT

Cocoa is a fruit of great economic importance around the world, however, its cultivation requires specific environmental conditions such as warm climate, high humidity in the environment, medium exposure to sunlight; in addition, it needs a high nutrient content of the soil. These conditions favor the growth of pathogenic microorganisms that damage the integrity of the fruits and can even affect the tree in general. The fungus *Moniliophthora roreri* is the pathogen that causes moniliasis, one of the main cocoa diseases that affects global productivity. Biological control agents are an alternative to combat different pathogens in cocoa fruits; these controls have different mechanisms of action to manage harmful effects. However, biological control agents are affected by different factors such as concentration, application medium or genetic factors. Therefore, using of an alginate-based coating to contain the control agent minimizes the influence of factors that alter its effectiveness. The antagonistic effect occurs as the inhibition of growth of the mycelium of the pathogenic fungus. Stopping this growth implies preventing the development of moniliasis in the fruit and, consequently, affecting the physicochemical characteristics of the fruits. These characteristics or attributes are related to the quality of the fruit and are susceptible to change. In addition, they are the main indicators of cocoa ripening and allow the harvest process to begin; however, these characteristics depend on factors specific to the species and environmental aspects. Therefore, this research aims to determine the control of a coating with a biological control agent that minimizes the development of moniliasis in cocoa fruits and allows the physicochemical characteristics of the different parts of the fruit to be preserved.

Keywords: *Moniliophthora roreri*, *Trichoderma harzianum*, biological control, preharvest techniques, physicochemical characteristics.

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos patógenos en plantas desarrollan resistencia a compuestos químicos empleados para su control, por lo tanto, es necesario cambiar o aumentar la dosis de uso generando dependencia a este tipo de compuestos. Según la OMS, un millón de casos de intoxicación y 200 000 muertes de trabajadores agrícolas se producen a causa de estos productos químicos, sin mencionar, la posible relación con enfermedades como hepatitis, malformaciones genéticas, daño en órganos y cáncer (Guzmán-Plazola et al., 2016).

En la actualidad, los consumidores buscan productos agrícolas cultivados libre de químicos; En particular, el cacao es un cultivo afectado por hongos con daños sobre la mazorca de forma interna y externa, como consecuencia, se estiman pérdidas del 10 % de la producción mundial, lo que implica, un daño económico importante para el productor (Ramírez Gil, 2016). Las pérdidas económicas por hongos en el 2018 en México, se estimaron en 24, 888, 090 USD por lo que es necesario controlar la aparición de hongos para evitar estas afectaciones (CEDRSSA, 2020).

La producción en el país decreció un 30% en los últimos años. Una de las principales causas de la disminución en la producción se debe al deterioro temprano en la mazorca. Esta situación es provocada por el hongo *Moniliophthora roreri* que genera la enfermedad de moniliasis o podredumbre helada (Hipólito-Romero et al., 2017).

Este hongo causa modificaciones en la pulpa de la mazorca de cacao. Algunas modificaciones frecuentes son aumento de peso, cambio de color y alteraciones en el aroma, estos cambios provocan la pérdida completa de la mazorca de cacao. Además, la esporulación del hongo es un factor determinante en la infección de otras mazorcas del mismo árbol o de árboles contiguos (Solís et al., 2016). El control en etapas tempranas de la enfermedad es necesario para evitar pérdidas biológicas y económicas para el productor.

Como respuesta es necesario buscar la forma de contrarrestar el crecimiento de los hongos en la mazorca de cacao sin el uso de agroquímicos. Una alternativa, es el uso de agentes de control biológico que compitan en el desarrollo del microorganismo dañino sin alterar las características del cultivo. El hongo

Trichoderma harzianum ha probado su efectividad en condiciones controladas de hasta 75 % de inhibición en *Moniliophthora roreri* (Tirado-Gallego et al., 2016).

Además, el uso de recubrimientos comestibles a base de carbohidratos, especialmente gomas, son de gran importancia en la industria para alargar la vida de anaquel, incluso, son empleados para esparcir agentes de control biológico con el propósito de mitigar los efectos de un microorganismo dañino (Solano-Doblado et al., 2018).

El objetivo del trabajo es determinar el control de un recubrimiento comestible con agente de control biológico sobre el desarrollo de moniliasis en mazorcas de cacao, sin alterar las características fisicoquímicas de las diferentes partes del fruto. Por lo tanto, es necesario plantear la interrogante sobre la relación en el desarrollo micelial del patógeno por parte del antagonico.

El tratamiento precosecha de las mazorcas de cacao consiste en la aplicación de un recubrimiento comestible a base de alginato de sodio, este recubrimiento contendrá 1×10^6 conidios/mL de *Trichoderma harzianum* para actuar antagonicamente sobre *Moniliophthora roreri*. El método de aplicación será mediante rociador de precisión en abanico de 2 m. de espaciado; la integridad del recubrimiento se determinará en base con la resistencia a la degradación por factores ambientales como temperatura, humedad relativa, cantidad de precipitación y corriente de aire.

Se pretende que el recubrimiento presente resistencia a temperaturas por debajo de los 45 °C, alta transferencia de antagonistas sobre la superficie de la mazorca de cacao y efecto inhibitor del crecimiento del patógeno de moniliasis. Basado en el control de la concentración de conidios y la colonización por el patógeno. El uso de los recubrimientos con agentes de control son una opción en el manejo de enfermedades y plagas en la agroindustria, debido a su bajo costo de adquisición y utilización lo que permite el uso de manera general y gradual para obtener los beneficios sobre el rendimiento de las plantas y la disminución de las pérdidas económicas y de productos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del cacao

El cacao (*Theobroma cacao*) es un árbol umbrófilo, con gran importancia económica, originario del centro y sur de América (Hipólito-Romero et al., 2017). Su domesticación data de épocas prehispánicas en México, sin embargo, un tipo de cacao crece de forma silvestre en la región del Amazonas y otras partes del mundo con clima tropical húmedo (Arévalo-Gardini et al., 2020; Cilas and Bastide, 2020). Las semillas de este fruto tienen gran importancia comercial en el mundo debido a la demanda por la industria alimenticia y cosmética (Dos Santos Silva et al., 2020). De las semillas de cacao se obtiene el chocolate, el cual, es el producto más relevante en el mundo seguido de la manteca, el polvo y el licor de cacao (Vásquez et al., 2019).

2.1.1. Fisiología del árbol de cacao

La especie de cacao pertenece a la familia de las *Malvaceae*, este árbol puede medir hasta 20 metros de altura en estado silvestre, sin embargo, la altura en cultivo alcanza los cuatro a ocho metros en promedio presentando la copa redondeada (Kongor et al., 2016); los frutos brotan del tronco (esta característica se conoce como sesilidad), tienen una forma alargada de 12 a 30 cm de largo con 30 a 40 semillas en forma ovalada contenidas en una pulpa mucilaginoso blanca (Figueroa-Hernández et al., 2019). En la Figura 1 se muestra la coloración y morfología de los tres tipos de cacao criollo, forastero y trinitario.

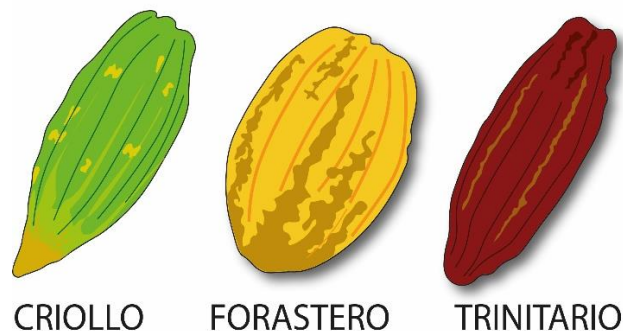


Figura 1. Morfología y coloración de las variedades del fruto de cacao.

El cacao criollo se caracteriza por su bajo contenido en taninos, aroma fuerte, tamaño del fruto mediano y semillas grandes. Es considerado el cacao de más alta calidad,

cultivado ampliamente en México y Venezuela (Avendaño-Arrazate, 2018). Por su parte, el cacao forastero se caracteriza por su coloración verde claro y amarilla, las semillas son pequeñas y de color púrpura. Aunque a menudo es catalogado como la variedad de más baja calidad, es el cacao más empleado por la industria debido a su alta resistencia contra enfermedades por microorganismos (Castro-Alayo et al., 2019). El cacao trinitario es considerado un híbrido entre las dos variedades antes mencionadas, el cual contiene la resistencia y cuerpo del cacao forastero con el aroma y sabor del cacao criollo (Cardenas et al., 2016).

Las flores del cacao son hermafroditas de color rosa y blanco en forma de estrella de cinco pétalos debido a esta constitución solo pueden ser polinizadas por insectos. La floración consta de aproximadamente 100,000 flores en dos periodos al año, al inicio de las temporadas de lluvia menor y mayor. Sin embargo, solo el 0.1% de estas flores llega a consolidarse como un fruto (de Souza et al., 2018). Por último, las hojas del árbol de cacao son de un color verdoso de forma elíptico-ovales de hasta 30 cm de longitud (Suárez Salazar et al., 2018). En la Figura 2 se ejemplifica la fisiología de un árbol de cacao de acuerdo a los frutos, las flores y las hojas.

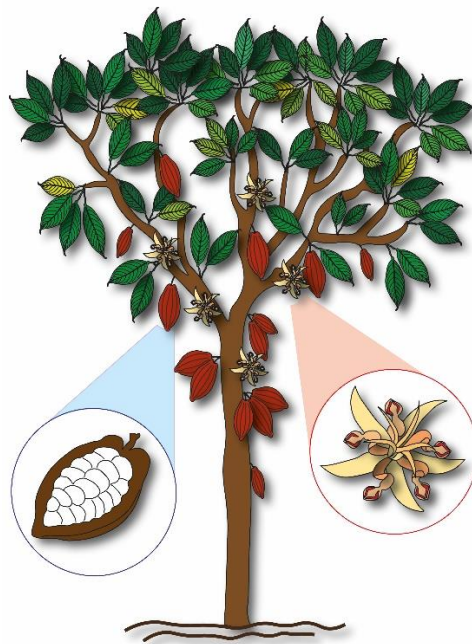


Figura 2. Fisiología del árbol de cacao de acuerdo los frutos, flores y forma de la copa.

2.1.2. Factores en el cultivo del árbol de cacao

Los factores precosecha para el cultivo de cacao se clasifican en dos grupos los factores extrínsecos e intrínsecos. Dentro de los factores extrínsecos se pueden encontrar los ambientales y los de cultivo. Los factores ambientales comprenden: la temperatura, la humedad, la climatología, el suelo y la irradiación de luz (Samaniego et al., 2020).

Los factores de cultivo se encuentran el tipo de patrón en el plantío, la poda, el aclareo y el control de plagas y enfermedades (Silva et al., 2019; Arévalo-Gardini et al., 2020). En cambio, los factores intrínsecos precosecha son el tipo de variedad, edad de la planta, tipo de fruto, y estado de maduración en la recolección de fruto (Aguilar and Guharay, 2013; Rojas et al., 2020).

Factores extrínsecos ambientales. Los suelos donde crece el cacao deben ser profundos que permitan la penetración de las raíces hasta de 1.5 m de profundidad. La composición del suelo debe presentar arcilla en combinación con arena o tierra suelta para mejores resultados, el equilibrio entre el tipo de suelo permitirá que el agroecosistema retenga humedad y tenga el drenaje para evitar encharcamiento de agua (Abdulai et al., 2020).

La calidad química del suelo se puede clasificar en tres: alta, media y baja, un suelo apto para el cultivo del cacao tendrá altos valores de Nitrógeno (N), Fosforo (P) y Potasio (K), además, contará con la presencia de Calcio (Ca), azufre (S) y magnesio (Mg) y oligoelementos como hierro (Fe) y cobre (Cu) que el cacao requiere en cantidades menores (Hosseini Bai et al., 2017).

El tipo de relieve donde se cultive el cacao también influye en la composición del suelo entre un terreno llano o una ladera. De misma manera el flujo de viento es un factor a considerar ya que si la corriente es fuerte será necesario el uso de un rompe vientos (Pérez and Contreras, 2017).

Los árboles de cacao son plantas adaptadas a ser cultivadas hasta los 900 msnm (África), sin embargo, altitudes por debajo de los 500 msnm son las ideales para plantaciones en centro y sur América (SAGARPA, 2017). La temperatura ideal para el agroecosistema del cacao se encuentra entre los 22 y 28 °C, la oscilación entre la

temperatura del día y de la noche puede variar en 9 °C, hasta tener un mínimo de 15 °C y un máximo de 38 °C (Aguilar and Guharay, 2013).

La cantidad de lluvia que recibe el agroecosistema determina la productividad del árbol, es necesario una cantidad de agua entre 1200 a 3000 mm por año, una cantidad menor puede provocar que la planta se marchite, por ende, es necesario implementar un sistema de riego (Schroth et al., 2016). Por lo tanto, la humedad relativa en el ambiente debe ser alta de aproximadamente del 70% - 90% (Vásquez et al., 2019).

La cantidad de luz que recibe el agroecosistema dependerá del tipo de arreglo, las plantas de cacao requieren un 50% de la cantidad de luz generada del día, un espacio demasiado abierto altera la humedad del ambiente y demasiada sombra promueve la aparición de microorganismos patógenos (Torres-De la Cruz et al., 2015).

Factores extrínsecos de cultivo. Las condiciones del agroecosistema influyen en la relación entre plantas ya que garantiza el crecimiento simbiótico de las plantas, mejora el deterioro del suelo e incluso mejora la calidad nutrimental de los frutos (López-Cruz et al., 2021). Las plantas que crecen en relación con el cacao son el plátano o el coco que funcionan como plantas “madre” ya que el cacao es umbrófilo y cuando está en crecimiento no es capaz de autogenerar la sombra necesaria. Otras plantas presentes en el agroecosistema del cacao son las leguminosas que ayudan a fijar los nutrientes al suelo (Armengot et al., 2020). En la Figura 3 se muestra el arreglo de un agroecosistema para el crecimiento íntegro del cacao junto a plantas madre y plantas fijadoras de nutrientes.



Figura 3. Diseño de un agroecosistema para el árbol de cacao con plantas madre y fijadoras de nutrientes.

Existen diferentes tipos de poda que se debe realizar para el debido funcionamiento del agroecosistema del cacao. La poda de formación consiste en la eliminación de ramas y hojas que no sean necesarias para el diseño del sistema (Gutiérrez-García et al., 2020).

La poda de mantenimiento sirve para determinar el tamaño del árbol, esto permite el control de plagas y la accesibilidad para la cosecha. Por último, la poda sanitaria, se utiliza para eliminar las partes del árbol dañadas o enfermas (Hoffmann et al., 2020).

Otra medida de control es el aclareo del agroecosistema de cacao que consiste en quitar la maleza alrededor de las plantas, esto es beneficioso para el sistema ya que permite que las plantas de cacao adquieran los nutrientes y la humedad del suelo (Torres-Guizado, 2016).

Factores intrínsecos. Las plantas de cacao son productivas a partir de su tercer año de vida, y después de los ocho años de productividad el rendimiento baja (Vásquez et al., 2019). Aunque el árbol produce frutos todo el año, la mejor época para la cosecha se centra entre los meses de octubre a marzo (Vanhove et al., 2020). El cacao es un

fruto no climatérico, por lo tanto, es importante determinar el tiempo exacto para su recolección, la clasificación por color del fruto es la manera visual de identificar el grado de madurez de la mazorca (Osorio et al., 2017). Existen otras formas para determinar la cosecha del cacao como medir el tamaño de las mazorcas o calcular la cantidad de sólidos solubles en la pulpa expresada en grados Brix, el cual se puede encontrar entre los 15 y 18° en el cacao maduro (Papalexandratou et al., 2019).

2.2. Procesamiento de las semillas de cacao

La Figura 4 muestra el procesamiento del cacao, el cual comienza con la recolección del fruto que por lo general es manual para no dañar el árbol, los frutos se clasifican por el color de maduración de amarillo a café oscuro y de rojo a naranja. Posteriormente se extrae la pulpa de las mazorcas con un corte longitudinal separando la cascara de la pulpa blanca (Robledo, 2018).

La cura es un proceso biomecánico dividido en dos etapas la fermentación y la condensación de las semillas de cacao. En la fermentación, la pulpa y las semillas del cacao comprende reacciones químicas, la primera fase es la fermentación anaeróbica a una temperatura de 35 a 45 °C se produce etanol, seguido de la fase aeróbica donde el etanol se transforma en ácido acético (Puerto et al., 2016).

El ácido acético provoca que el grano no pueda germinar, en esta fase la temperatura alcanza 50 °C regulándose hasta 45 °C. Terminando la fermentación (5 a 7 días) el grano se encuentra hinchado y la coloración de la cascara es más oscura (Rodríguez et al., 2016).

El secado de los granos se realiza exponiendo estos al sol o mediante una maquinaria con el objetivo de reducir la humedad hasta el 5%. En esta etapa se controla la pérdida de ácidos orgánicos volátiles y oxidación de los polifenoles, esto comienza a generar el sabor y aroma característico mediante la reducción de la acidez, la astringencia y el amargor. La temperatura de secado debe ser menor a 70 °C para no perder la calidad sensorial, este proceso ayuda al almacenamiento del grano y evitar la presencia de moho principalmente *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Jiménez et al., 2018; Salazar et al., 2020).

Se realiza una selección de granos como prueba de calidad, posteriormente, se realiza

la limpieza y depuración de los granos que consiste en separar los granos de objetos extraños y clasificar por tamaño para asegurar un tostado uniforme (Robledo, 2018).

En la etapa del tostado ocurren reacciones de pardeamiento no enzimático, este proceso potencializa el sabor, el aroma y el color. La temperatura del tostado depende del tipo de cacao que comprende desde los 110 hasta 130 °C por periodos de tiempo de 45 a 60 minutos (Zapata Bustamante et al., 2015).

Para finalizar se realiza el descascarillado de los granos y la molienda, este último proceso consta de dos pasos el triturado y el refinado. La finalidad del proceso es derretir la grasa de la manteca de cacao por medio de fricción para generar una masa semilíquida que se conoce como pasta o licor de cacao (Robledo, 2018).

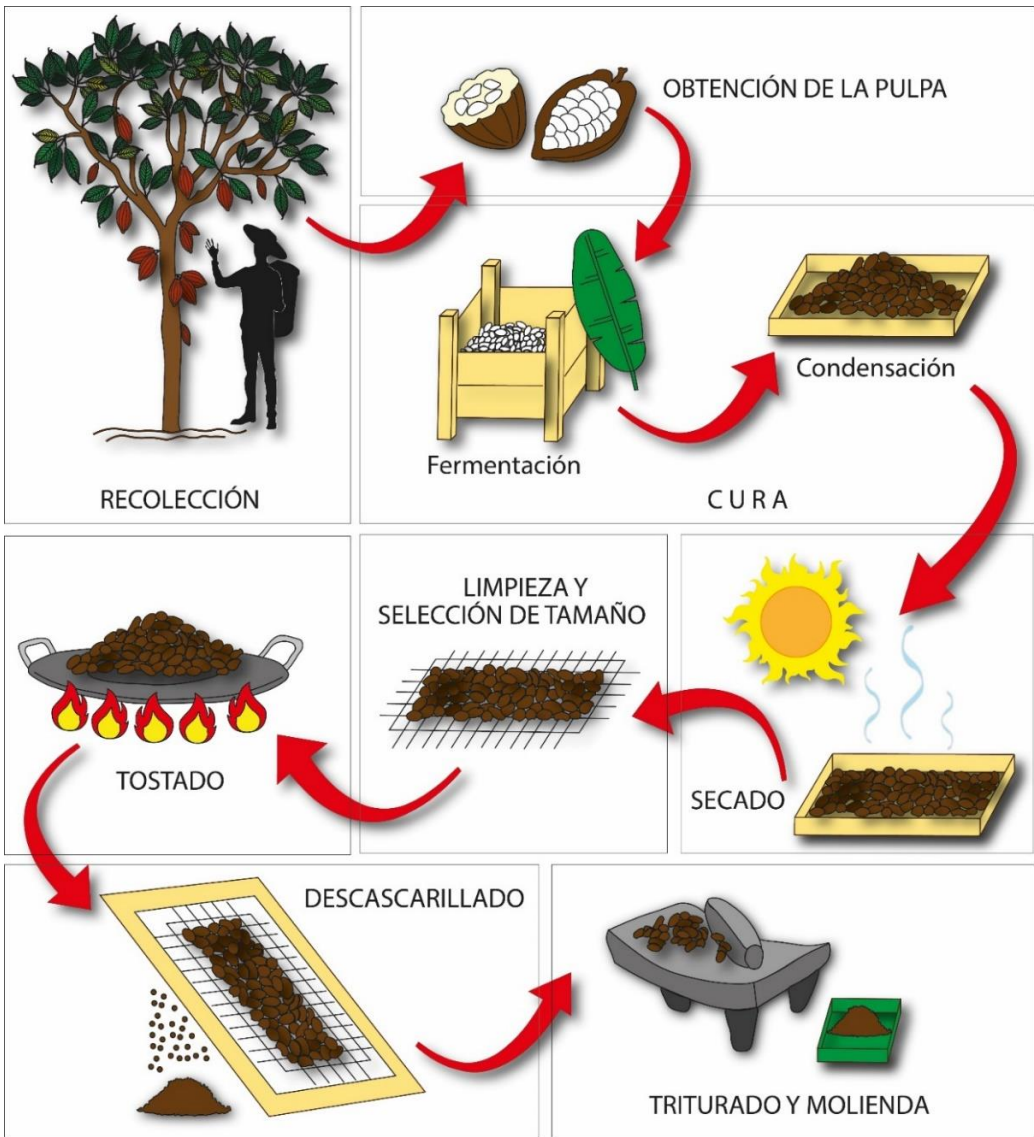


Figura 4. Procesamiento tradicional de las semillas para obtener una pasta de cacao.

2.3. Importancia comercial del cacao y productos derivados en el mundo

México es el decimotercer país productor de cacao, los estados de Tabasco y Chiapas generan entre 300 y 400 Kg/Ha con una superficie cultivada de 60,000 hectáreas. En los últimos diez años la producción anual se ha encontrado entre las 21 y 30 mil toneladas (SIAP, 2016; PROFECO, 2018).

En el año 2018 se estimó que la producción de cacao anual en toneladas fue de 28 607, que representa un ingreso económico de 82 960 300 USD (SIAP, 2018). Estos valores representan el 41.22% de los requerimientos del país, el resto lo consigue de importaciones de otros países como de Ecuador (35.44%), Costa de Marfil (12.38%), República Dominicana (8.97%), Colombia (1.94%) y Ghana (0.01%) (SIAP, 2017).

La producción de cacao ha decaído un 30% en los últimos años, una de las causas de este decrecimiento es el inadecuado manejo del fruto y como consecuencia provoca enfermedades por hongos y bajos rendimientos (Hipólito-Romero et al., 2017). Las pérdidas económicas por hongos en el 2018 en México, se estimaron en 24 888 090 USD por lo que es necesario controlar la aparición de hongos para evitar pérdidas (FAO, 2019).

El grano, la manteca, el polvo y el chocolate son los productos derivados del cacao que se comercializan en el mundo (Vásquez et al., 2019). El consumo en Europa como en Estados Unidos y Canadá ha aumentado poco pero continuo, sin embargo, en países de Asia, Oceanía, África y América Latina el aumento fue importante (Arvelo et al., 2016)

El 55% del consumo de cacao en grano se concentra en siete países, Estados Unidos representa el 20%, Alemania el 9%, Francia el 6%, Reino Unido el 6%, Brasil el 5%, Rusia el 5% y Japón el 4%. En la Figura 5 se muestra la comparativa entre México y los países con mayor consumo de granos de cacao en forma de chocolate per cápita de forma anual (PROFECO, 2018; Robledo, 2018).

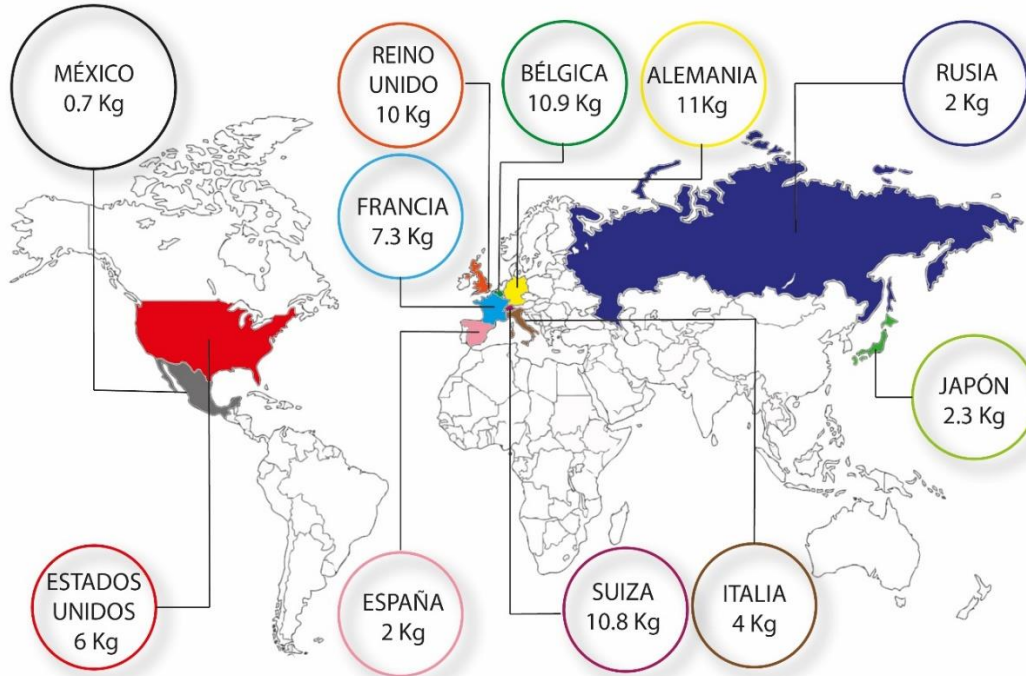


Figura 5. Comparativa entre México y los países con mayor consumo per cápita de granos de cacao en forma de chocolate.

El consumo de granos de caca o chocolate en México es deficiente con respecto a otros países debido a cuestiones comerciales, puesto que el 79% de las exportaciones de cacao son principalmente para Bélgica y Estados Unidos (CEDRSSA, 2020). Incluso, en América Latina existen países con mayor consumo per cápita que México como Chile, Uruguay, Brasil, Argentina y Perú (Jaramillo-Cuetochambo and López-Martínez, 2019). En la Tabla 1, se muestra algunas de las compañías productoras más importantes a nivel mundial proceden de los países con mayor número de importaciones.

Tabla 1. Principales compañías productoras de chocolates en el mundo en 2020.

Lugar	Compañía	Procedencia	Ventas netas (millones USD)
1	Mars Inc.	Estados Unidos	18,000
2	Ferrero Group	Italia	13,000
3	Mondelez Internacional	Estados Unidos	11,800
4	Meiji Co., Ltd.	Japón	9,721

5	Hershey Co.	Estados Unidos	7,986
6	Nestlé SA	Suiza	7,925
7	Lindt & Sprungli AG	Suiza	4,574
8	Pladis	Reino Unido	4,515
9	Haribo GmbH & Co. K.G.	Alemania	3.300
10	Ezaki Glico Co. Ltd.	Japón	3,156

Elaboración propia basados en los datos de (Candy Industry, 2020)

2.4. Las enfermedades del cacao

De acuerdo con la Organización Internacional del Cacao (2015) del 30% al 40% de la producción mundial se ve afectada por plagas y enfermedades. Dentro de las enfermedades más comunes se encuentran: escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), moniliasis o podredumbre helada (*Moniliophthora roreri*), mazorca negra (*Phytophthora*). Además de algunas enfermedades provocadas por la zona geográfica de cultivo como el virus del brote hinchado en África (*Phytophthora megakaria*) y la muerte regresiva de la estría vascular en Asia. Por su parte, las plagas que atacan al cacao incluyen insectos de la familia *miridae* y el barrenador del cacao (McMahon and Purwantara, 2016; Campos-Vega et al., 2018; Cilas and Bastide, 2020). En la Tabla 2 se muestra las principales enfermedades causadas por hongos que afectan a las diferentes partes del árbol de cacao.

Tabla 2. Enfermedades causadas por hongos que afectan diferentes partes del árbol de cacao.

Microorganismo / agente causal	Enfermedad	Descripción	Referencia
<i>Moniliophthora roreri</i>	Moniliasis	Es la principal enfermedad del cacao en México y América Central, La moniliasis afecta a más del 80% de los frutos de cacao. Las medidas empleadas para el control son las prácticas agrícolas.	(Reyes-Figueroa et al., 2016)
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Escoba de bruja	Es el hongo que afecta en mayor proporción al cacao en Brasil. Esta enfermedad se caracteriza por tener dos fases, la primera de ellas es biotrófica, es decir, el parasito se alimenta de las células vivas del hospedero. Mientras la segunda fase es necrotrófica, es decir, que el parasito se alimenta de las células muertas del hospedero. La muerte programada de las células y la acumulación de H ₂ O ₂ sirven como un mecanismo de defensa, el cual es usado por el hongo para aumentar la esporulación y la propagación.	(Martins Alves et al 2019)
<i>Phytophthora</i>	Mazorca negra	Es la enfermedad más importante a nivel global con pérdidas del 20 a 30% de la producción mundial de cacao. Las dos especies principales de estas pérdidas son <i>Phytophthora megakarya</i> y <i>Phytophthora palmivora</i> . Estos hongos presentan alta esporulación y provocan necrosis en el fruto. Esta enfermedad afecta principalmente a los granos.	(Mbarga et al., 2020)
<i>Phytophthora</i>	Cáncer de tronco	Causado por la especie <i>Phytophthora palmivora</i> , es una enfermedad que comienza en los brotes tiernos superiores extendiéndose hacia el la raíz del árbol. Los síntomas que se presentan son laceraciones de coloración rojiza por debajo de la corteza. Además, en la raíz estas lesiones de color café pueden causar alteraciones en la nutrición del árbol provocando la muerte.	(Phillips-Mora and Cerda Bustillos, 2009)

<i>Rosellinia</i>	Roselinia	Es un hongo presente en el suelo del agroecosistema, los árboles con deficiente nutrición son los más afectados. Esta enfermedad afecta la raíz, el tallo provocando que ocurra una mala absorción de nutrientes. Esta deficiencia cambia la coloración del follaje y finalmente absición completa.	(de Medeiros and da Silva, 2019)
<i>Ceratocystis cacaofunesta</i>	Mal del machete	Este hongo presente en el suelo provoca obstrucciones internad por esporas en el tronco y ramas del árbol. Esto provoca un marchitamiento mortal. Para que esta enfermedad pueda ocurrir se necesita una lesión expuesta en el árbol y la transmisión por parte de insectos perforadores como escarabajos.	(Fourie et al., 2018)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Esta enfermedad es la más frecuente en el cacao pos cosechado. El hongo se encuentra en los ambientes tropicales de alta humedad. Aunque ataca principalmente al fruto, las hojas y las ramas nuevas son muy susceptibles a esta enfermedad provocando un cambio de coloración y sequedad en el exterior. Es muy común el contagio por contacto de insectos, herramientas y esparcimiento por el aire.	(Barrios-Roblero e al., 2019)

Elaboración propia

2.4.1. Moniliasis en el árbol de cacao

La Moniliasis es causada por *Moniliophthora roreri*, patógeno perteneciente a la familia *Marasmiaceae*, cuyo método de infección son esporas (Cárdenas Pardo et al., 2017). Es una enfermedad fácil de identificar, si un fruto se encuentra infectado, presentará aumento en su peso, aunque existen otros signos de ello, presencia de deformaciones, madurez prematura y manchas aceitosas, manchas irregulares de color café, micelio incipiente en una mancha marrón, micelios fúngicos en manchas cafés (etapa más contagiosa) y forma alargada (momificada) del fruto (Marelli et al., 2019).

Este hongo se propaga hacia frutos sanos a través del aire, humanos que manipulan los frutos o algunos animales que se alimentan de ellos. Los frutos jóvenes son más propensos a padecer esta enfermedad que por lo general infecta en los tres primeros meses de formación, sin embargo, el daño es visible varias semanas después (Vásquez et al., 2019; Leiva et al., 2020).

En la Figura 6 se muestra las diferentes etapas de la moniliasis que dura alrededor de 85 días, un fruto de cacao sano en la primera etapa es infectado por el hongo, 30 días después aparecen los primeros síntomas (etapa 2), de 20 - 50 días después manchas marrones aparecen en la corteza del fruto (etapa 3), 8 - 12 días después el micelio aparece y produce las primeras esporas (etapa 4) y por último, en la etapa 5, las esporas continúan produciéndose hasta por siete meses, durante los cuales se dispersan, infectando más frutos (Phillips-Mora and Cerda Bustillos, 2009; Evans, 2016). Sólo el 30% de los árboles cultivados son de variedades mejoradas genéticamente, por lo que resulta importante desarrollar técnicas para el tratamiento de aquellos frutos que no presentan esta mejora (Gutiérrez et al., 2016).

Para el control y disminución en la incidencia de estas enfermedades se ha recurrido al uso de enzimas líticas producidas por hongos y bacterias, así como el mejoramiento genético de las variedades del cacao (Tirado-Gallego et al., 2016).

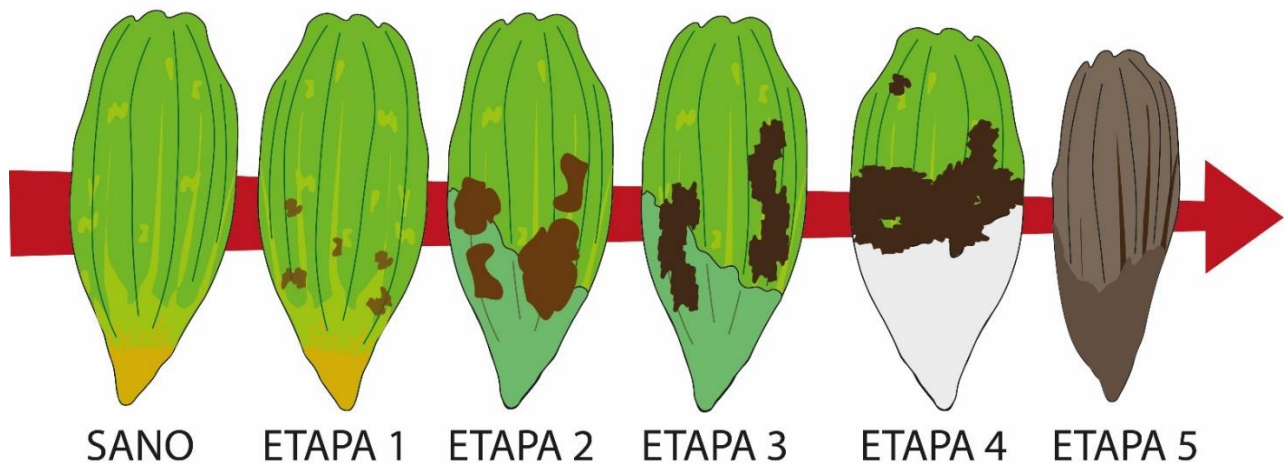
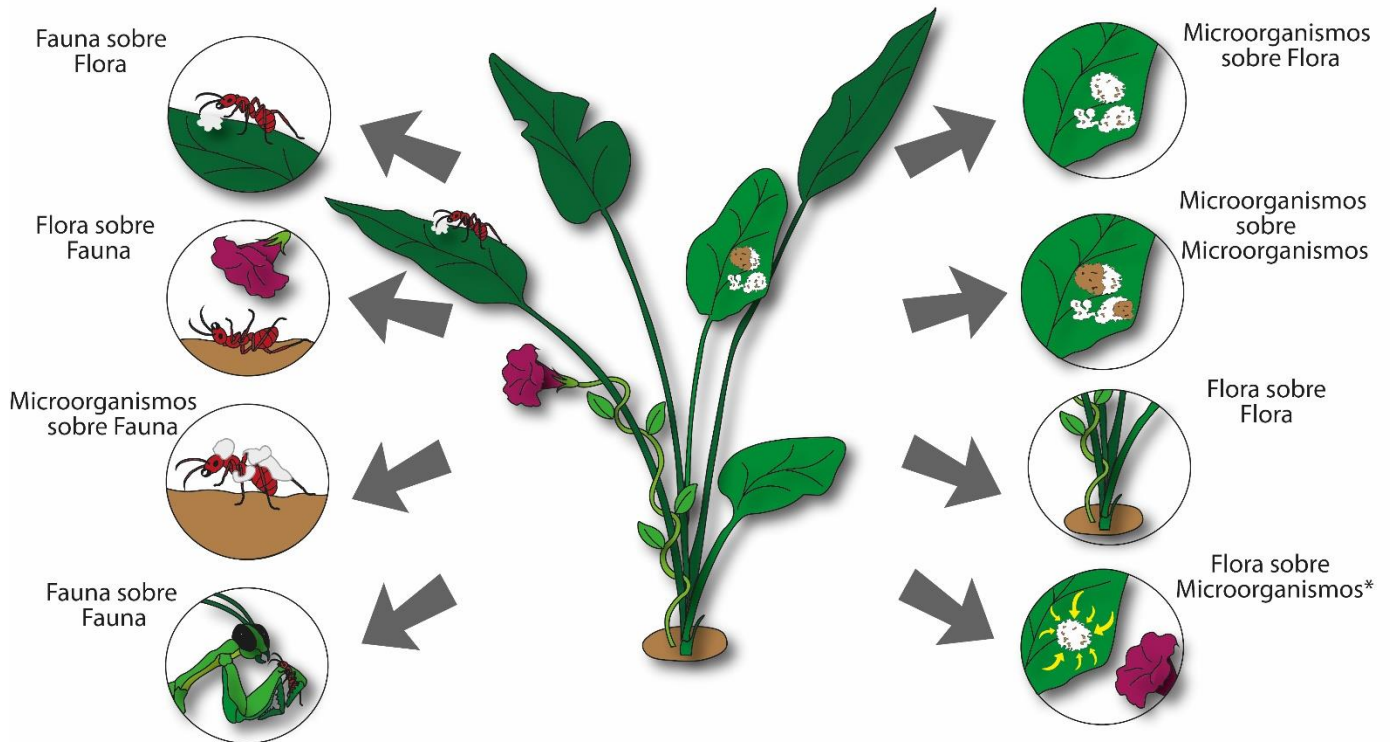


Figura 6. Desarrollo por etapas de la enfermedad causada por *Moniliophthora roreri* en un fruto de cacao.

Las estrategias para el control de moniliasis se basan en un adecuado manejo precosecha del árbol, esto se logra con una serie de prácticas fitosanitarias que buscan mejorar las condiciones del ambiente en el crecimiento de cacao, entre las acciones esenciales se encuentra la remoción de mazorcas momificadas y enfermas periódicamente (Leiva et al., 2020)

2.5. Control biológico

En la agricultura el uso de químicos para el manejo de enfermedades y plagas ha fomentado la resistencia de los organismos por lo que se buscan formas de mitigar los efectos de esta adaptación el control biológico se basa en un método agrícola para el manejo de fitopatógenos y agentes perjudiciales en un ambiente específico mediante el uso de organismos y prácticas orgánicas (Acosta-Rojas and Villa, 2017). En los últimos años se ha popularizado el uso de controles biológicos para el manejo de las enfermedades, además, para el fortalecimiento de las plantas mediante inducción de resistencia (Vélez et al., 2017). En la Figura 7 se muestra algunos ejemplos sobre la interacción entre organismos para el control biológico de plagas y enfermedades en los cultivos.



*Influencia externa para resistir enfermedades

Figura 7. Control biológico entre los diferentes organismos presentes en un ecosistema.

El uso del control biológico depende del tipo de amenaza que enfrenta un cultivo, se puede clasificar este método en tres variantes: clásico, aumentativo y de conservación. El control biológico clásico es el más empleado en la agroindustria, el cual consta de la introducción de una especie depredadora para reducir el número de población dañina nativa sin afectar el entorno o el hospedero (Vázquez, 2017; Arcaya-Sánchez et al., 2018; Barreda et al., 2019). Otra variante es el aumentativo basado en el incremento gradual de una especie depredadora introducida o nativa presente en el ecosistema con la finalidad de diezmar la población dañina, este tipo de control biológico es más especializado debido a que la especie depredadora requiere de asistencia para aumentar su población de manera relevante ante la especie dañina (Pereyra et al., 2016; Rodríguez-Palomera et al., 2016; Ovruski et al., 2017). Finalmente, el último tipo de control biológico está centrado en la conservación de la fauna y flora en un ecosistema, sin embargo, se favorece las condiciones ambientales y de producción del depredador para acrecentar la población y limitar el daño producido por el patógeno (Berensztein et al., 2017; Miras et al., 2017).

El uso de tecnologías basadas en la aplicación de agentes de control biológico (ACB) como bacterias y hongos han cobrado mayor relevancia por su potencial en la industria (Villamil Carvajal et al., 2014). Los géneros más utilizados para el control biológico son: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma* y *Streptomyces*, uno de los más importantes es el género *Trichoderma* debido a sus diferentes mecanismos de acción en el control de enfermedades (Martínez-Padrón et al., 2017). Se ha encontrado que una manera efectiva de controlar el crecimiento y proliferación de los patógenos, es a partir de la integración de ACB con fungicidas de síntesis química, obteniendo resultados similares al uso de altas concentraciones de fungicidas sintéticos (Albittar et al., 2016).

2.6. Uso de *Trichoderma spp.* como agente de control biológico

Dentro de los ACB, el *Trichoderma spp.* es un hongo filamentosos perteneciente a la clase *Deuteromycetes*. Fue descrita en 1794 por Persoon, sin embargo, en los últimos 50 años se ha descrito su capacidad antagónica (Khan and Mohiddin, 2018). Es un género de hongo que puede crecer en suelos con alto contenido de materia orgánica, con pH desde 5.5 hasta 8.5, (ideal de 5.5 a 6.5) con temperaturas de 4 °C hasta los 41 °C. dependiendo del tipo de *Trichoderma* (Martínez et al., 2013).

El *Trichoderma* crece en forma de hifas entre los 3 - 12µm de diámetro las cuáles son la primera forma de propagarse, las clamidosporas y los conidios son las otras dos formas (Espinoza-Ahumada et al., 2019). Este es un hongo muy favorable para un agrosistema, ya que funciona como un microorganismo simbiótico en raíces y como antagónico en toda la planta (Osorio-Hernández et al., 2009). Existen diferentes mecanismos para el control de hongos y otros patógenos en plantas.

Antagonismo. Un agente antagónico es aquel que se enfrenta a la acción, crecimiento y desarrollo de otro organismo, por diferentes medios como la competencia; el *Trichoderma* es un hongo que permite el biocontrol debido a que compete con el patógeno por el espacio disponible para el crecimiento y por los nutrientes (Pérez et al., 2017; Leiva et al., 2020).

Micoparasitismo. Este es un mecanismo de patógeno - antagonista complejo, la forma

en la que se lleva a cabo se puede dividir en etapas. El proceso inicia con la identificación a la distancia del patógeno por parte del organismo antagonico, después ocurre una interacción de las hifas del antagonista, es cuando ocurre la actividad lítica, donde se producen las enzimas que degradan la pared celular del patógeno principalmente (glucanasas, proteasas y quitinasas), finalmente, el proceso concluye con la degradación del contenido citoplasmático (Martínez et al., 2013).

Antibiosis. Es un proceso por el cual un organismo genera sustancias toxicas para otro organismo sin que exista contacto directo entre ellos. En el caso del *Trichoderma* es capaz de generar sustancias que se consideran antibióticos efectivos contra varios patógenos, estas sustancias pueden ser dióxido de carbono, etanol, acetona entre otros más (Osorio-Hernández et al., 2009).

Los agentes de control biológico son una opción eficaz ante el uso de químicos para el control de plagas. El *Trichoderma* se ha empleado de manera eficiente en condiciones de laboratorio actuando como biocontroladores de diferentes patógenos (Vélez et al., 2017). Recientemente, se ha mencionado que el *Trichoderma* puede inducir respuestas que favorecen a la planta en cuanto a su crecimiento y resistencia a estreses bióticos y abióticos (Pérez et al., 2017).

Las especies más utilizadas para el control biológico son del género *Trichoderma*, dentro de las cuales se encuentran: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma ovalisporum* (reducción de hasta un 23.8% de la moniliasis en cultivos de cacao), *Trichoderma stromaticum*, *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma asperellum* (Herrera et al., 2020). Por su parte, dentro de los agroquímicos más empleados se pueden encontrar: óxido e hidróxido de cobre, azoxistrobina y propiconazole (Yépez et al., 2019).

Respecto al *Trichoderma harzianum*, esta especie se destaca por su producción de antibióticos y enzimas (sustancias antifúngicas) como la β -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa, que actúan como degradadores de la pared celular, así como ácido nonanoico, que ha reportado actividad inhibitoria in vitro en el crecimiento micelial y germinación de esporas tanto para *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* de hasta un 75% (Tirado-Gallego et al., 2016).

2.7. Recubrimientos comestibles

Existen diferentes medidas para minimizar los efectos de deterioro de los frutos como el uso de agentes biológicos, mantenerlos a bajas temperaturas, radiaciones ultravioletas y el uso de películas y recubrimientos comestibles (RC) (Fernández Valdés et al., 2015). Este último se define como una capa de un material comestible sobre un producto orgánico con el fin de mantener sus cualidades, reducir los procesos de deterioro por microorganismos y alargar su vida útil (Fernández et al., 2017). Uno de los principales objetivos de este procedimiento es la inactivación de enzimas y de microorganismos que afecten al producto, sin generar los efectos de los procesos convencionales (Ancos et al., 2015). En la Tabla 3 se muestran los mecanismos de obtención para generar una película o recubrimiento comestible.

Tabla 3. Tipo de mecanismos de obtención de películas y recubrimientos

Mecanismo	Descripción	Referencia
Eliminación del disolvente	Se forma una solución con los aditivos y se elimina el disolvente formando una capa delgada seca del plastificante.	(Solano-Doblado et al., 2019)
Gelación	Usado para proteínas aplica un tratamiento de calor que forma un gel estructurado alrededor del alimento.	(Ji et al., 2019)
Solidificación	Se forma una mezcla entre los componentes y se dispone como capas en el alimento hasta su solidez.	(Makhatha et al., 2018)
Casting	Cuando ya se tiene la película o un recubrimiento se evapora el disolvente a temperatura y humedad controlada.	(Eslamian and Soltani-Kordshuli, 2018)
Electrohilado	Por medio de campos eléctricos y una diferencia de potencial se evapora el solvente para formar una película de tamaños hasta nanométricos.	(Armstrong et al., 2018)

Elaboración propia

2.7.1. Materiales empleados en recubrimientos comestibles

Los materiales empleados para un RC se clasifican en tres grupos: polisacáridos, lípidos y proteínas (Ancos et al., 2015). Los hidrocoloides son los materiales más empleados por la industria, principalmente los polisacáridos y las proteínas de origen animal o vegetal (Fernández Valdés et al., 2015). Los lípidos son un compuesto hidrofóbico que genera una barrera ante la humedad, sin embargo, no forma una capa completa en el alimento. Mientras los materiales compuestos son mezclas entre hidrocoloides y lípidos que según la mezcla se determinan las características al alimento (Fernández et al., 2017). En la Tabla 4 se muestran algunos de los materiales más utilizados para el recubrimiento comestible de cada grupo.

Tabla 4. Materiales empleados como recubrimientos comestibles

Grupo	Materiales	Referencia
Polisacáridos	Agar, alginato, carragenina, goma arábica, almidón, dextranos, sacarosa, jarabe de maíz, pululano, quitosano, celulosa, pectina.	(Suhag et al., 2020) (Nechita and Roman (Iana-Roman), 2020)
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácidos esteáricos, trisetearina.	(Hassan et al., 2018) (Ju et al., 2019)
Proteínas	Gluten, caseína, albúmina, gelatina, colágeno, proteína de maíz, soya.	(Dehghani et al., 2018)

Elaboración propia

El alginato de sodio (SA) es un material perteneciente a los hidrocoloides caracterizado por ser un biopolímero lineal compuesto por ácidos D-manúrico y L-gulurónico extraído de algas marinas, este material es ampliamente usado debido a su nula toxicidad para el ser humano y tiene la versatilidad de formar esferas, capsulas y geles (Hernández-Torres et al., 2016). En la Figura 8 se muestra las ventajas del uso de alginato de sodio como recubrimiento comestible como alargar la vida útil mediante la barrera de gases y humedad, y la protección de compuestos volátiles e ingredientes funcionales.



Figura 8. Ventajas del uso de recubrimientos comestibles sobre alimentos.

2.8. Uso de recubrimientos comestibles con agentes de control biológico

Los recubrimientos comestibles a base de alginato de sodio se han empleado contra patógenos mediante técnicas de encapsulamiento de microorganismos para el control biológico (Sosa-del Castillo et al., 2015). Los hongos son empleados debido a sus características antagónicas en el crecimiento de otros organismos (Fernández-Jiménez et al., 2019). Además, algunos metabolitos producidos por bacterias producen un efecto de antibiosis (Alviz et al., 2017).

La acción de un recubrimiento puede aplicarse de dos formas el traslado parcial o total de los microorganismos al fruto, mientras, la segunda forma de aplicación es inocular el antimicrobiano o fungicida en el recubrimiento o directamente en el producto alimenticio (Solano-Doblado et al., 2019). En la Tabla 5 se muestran algunos estudios realizados con microorganismos para el control biológico de plagas y enfermedades.

Tabla 5. Estudios de microorganismos empleados en el control biológico de agentes dañinos en plantas.

Microorganismo (Antagónico)	Agente dañino	Hospedero	Referencia
<i>Aureimonas altamirensis</i>	<i>Phytophthora nicotianae</i>	Piña	(González et al., 2019)
<i>Bacillus toyonensis</i>			
<i>Herbaspirillum huttiense</i>			
<i>Micronospora marítima</i>			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Penicillium italicum</i>	Limero	(Hernández-Montiel et al., 2018)

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Naranja	
<i>Cryptococcus diffluens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Chile	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Alternaria solani</i>	Tomate	
<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Higuera	
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Papaya	
	<i>Alternaria alternata</i>	Albahaca	
	<i>Fusarium solani</i>	Garbanzo	
	<i>Curvularia sp.</i>	Palma	
<i>Bacillus foraminis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Tomate	(López et al., 2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Corynespora cassicola</i>		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Stemphylium lycopersici</i>		
<i>Bacillus thioparans</i>			
<i>Micrococcus yunnanensis</i>			
<i>Paenibacillus polymyxa</i>			
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Pepino	(Villanueva, 2018)
<i>Trichoderma asperellum</i>			
<i>Trichoderma fertile</i>			
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Diaphorina citri</i>	Cítricos	(Berlanga-Padilla et al., 2018)
<i>Hirsutella citriformis</i>			
<i>Isaria javanica</i>			
<i>Lanosoniveum</i>			
<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	In vitro	(Martínez-Padrón et al., 2017)
<i>Trichoderma hamatum</i>			
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Frijol	(Stocco et al., 2019)

Elaboración propia

La enfermedad se expresa y dispersa mediante las características intrínsecas de susceptibilidad del hospedante y las características del sistema. Es por esto, que el éxito o fracaso de las estrategias para el control de enfermedades depende del uso de métodos y modelos adecuados, considerando la relación de patógenos, el hospedante, las variables ambientales y el manejo del cultivo (Cárdenas-Pardo et al., 2017).

3. HIPÓTESIS

La aplicación precosecha de un recubrimiento comestible a base de alginato de sodio inoculado con *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico disminuirá significativamente el desarrollo de moniliasis en mazorcas de cacao infectas en contraste con un tratamiento control carente de control biológico. Las variables de comparación serán las características fisicoquímicas de los frutos de cacao antes y después de la aplicación del antagonista.

4. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un recubrimiento comestible a base de alginato de sodio con *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico aplicado en precosecha que disminuya el crecimiento de moniliasis en mazorcas de cacao infectadas, sin alterar las características fisicoquímicas de las diferentes partes del fruto de cacao.

4.1. Objetivos Particulares

Determinar la calidad de los nutrientes del suelo y la influencia de las prácticas culturales precosecha para incrementar el rendimiento de las mazorcas de cacao en los periodos principales de producción, mediante el mejoramiento del estado fitosanitario del agroecosistema y el fortalecimiento de los cultivos.

Obtener un recubrimiento orgánico a partir de alginato de sodio adicionado con glicerol como plastificante para contener un agente de control biológico viable hasta su aplicación sobre las mazorcas de cacao, evaluado mediante el análisis de sus propiedades físicas y mecánicas.

Comparar el comportamiento de las aplicaciones del recubrimiento orgánico de alginato de sodio sobre las mazorcas de cacao para establecer las condiciones del proceso específicas, determinado por el estado fisiológico de los frutos y las condiciones ambientales.

Estimar el efecto del agente de control biológico sobre el hongo que provoca la moniliasis en las mazorcas de cacao para conocer el nivel de antagonismo entre

ambos microorganismos, a través del cálculo del porcentaje de parasitismo, antibiosis, antagonismo, inhibición e incidencia.

Evaluar las características fisicoquímicas de las mazorcas de cacao antes y después de la aplicación del recubrimiento comestible inoculado del agente de control biológico, con el propósito de identificar el efecto en sus propiedades y el contenido de compuestos.

5. METODOLOGÍA

5.1. Material biológico, lugar del estudio y diseño experimental

Se utilizaron árboles de cacao de una subespecie criolla de siete años de antigüedad ubicados en un agroecosistema local predominantes de especies forestales y frutales. El estudio incluyó los periodos de producción 2020/2021, 2021/2022 y 2022/2023, se consideraron solo las producciones principales comprendidas de agosto – enero. Las mazorcas empleadas en los estudios fueron tomadas a las seis semanas de formación.

El agroecosistema se encuentra en la zona de la huasteca potosina, en la localidad de Huichihuayán, en el municipio de Huehuetlán, en el estado de San Luis Potosí (21° 45' N; 99° 03' E). Esta área se encuentra en una altitud de 245.81 msnm. El clima es predominantemente cálido y húmedo con temperaturas promedio de 22°C. La precipitación promedio anual es 1650 mm y la humedad se encuentra en un rango de 76% en abril a 83% en septiembre.

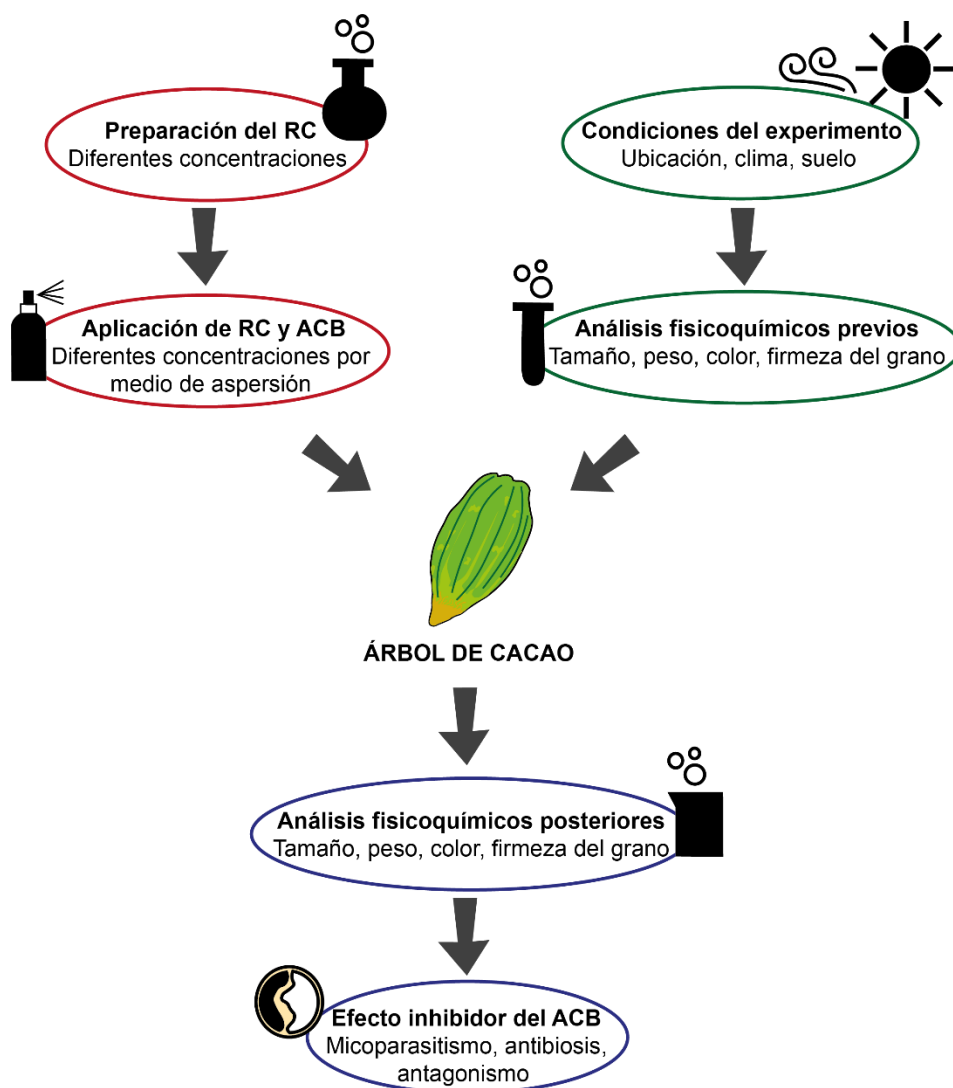
Para el estudio, se delimitaron tres zonas de 30 x 30 metros, los árboles se encuentran espaciados aproximadamente por 3 – 4 metros entre troncos. La densidad de árboles para el estudio fue en promedio 79 para cada zona, en cada zona experimental se aplicaron técnicas culturales precosecha y análisis de calidad del suelo. Se delimitó una zona control dentro de la misma plantación separada de las tres zonas experimentales por 10 metros.

La base del recubrimiento comestible se elaboró con alginato de sodio (CAS 9005-38-3). Para plastificar el recubrimiento se empleó glicerol (CAS 56-81-5) y cloruro de calcio (CAS 10043-52-4) como elemento reticulante. Los productos anteriores

fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, México. Además, se utilizó *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico de la marca *Trichospore* en relación de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo.

5.2. Métodos

En la Figura 9, se muestra el diagrama general de la metodología dividida en las diferentes etapas de la experimentación. El esquema se realizó para dividir la fase de precosecha de los análisis postcosecha.



RC: recubrimiento comestible; ACB: agente de control biológico

Figura 9. Diagrama general de las etapas de la metodología

5.2.1. Prácticas culturales precosecha: Poda y aclareo

Las tres zonas experimentales y la zona control fueron tratadas con tres tipos de poda. Se aplicó una poda de formación para obtener una copa tipo “paraguas” de máximo tres metros de diámetro. Se realizaron podas de mantenimiento de forma semestral para eliminar ramificaciones secundarias y podas sanitarias de forma bimestral para remover frutos y partes dañadas. El área circundante de los árboles fue despejada de forma mensual para erradicar malezas. Estas prácticas se realizaron de forma manual durante los periodos de producción (Armengot et al., 2020).

5.2.2. Calidad del suelo

El análisis del suelo se realizó tomando muestras a 60 cm de profundidad de diez diferentes puntos de cada zona de experimentación. Las muestras se dividieron en dos partes para evaluar las características físicas y químicas. La primera parte se secó, trituró y tamizó en una malla de dos mm para medir el pH mediante el método 1:2 suelo/agua destilada, fósforo (P) mediante el método de Olsen (Gu et al., 2021), materia orgánica mediante el método de digestión húmeda, Potasio (K) y sodio (Na) mediante fotometría de emisión de llama, calcio (Ca) y magnesio (Mg) mediante el método del versenato (Mahaly et al., 2018), zinc (Zn) mediante espectroscopia atómica de absorción (Khatun et al., 2018), boro (B) mediante el método de soluble en agua caliente (Taherian et al., 2019), azufre (S) mediante extracción con CaCl_2 al 0.15% (Mishra et al., 2018) y nitrógeno (N) mediante el método alcalino KMnO_4 (Chatterjee and Acharya, 2018). La segunda parte se utilizó para determinar el punto de saturación, capacidad de campo, punto de marchitez permanente, condición hidráulica y densidad aparente (Obia et al., 2018).

5.2.3. Elaboración de suspensión de alginato de sodio y solución reticulante

Suspensión de alginato de sodio

Para realizar cada suspensión se pesó la concentración de alginato de sodio y disolvió en 60 mL de agua destilada. Posteriormente, se agregó la cantidad de glicerol y mezcló hasta homogeneizar. Este proceso se realizó mediante agitación magnética en un barnstead thermolyne SP46 (Iowa, USA) por 30 minutos a 25 °C,

posteriormente, se aforó a 100 mL y dejó en reposo por 24 horas. En la Tabla 6 se muestra los tratamientos para la elaboración del recubrimiento y glicerol.

Tabla 6. Composición de los recubrimientos a partir de alginato de sodio y glicerol.

Tratamiento	Alginato de sodio (%)	Glicerol (%)
1	1	1
2	1	2
3	1	3
4	1.5	1
5	1.5	2
6	1.5	3
7	2	1
8	2	2
9	2	3

Solución de cloruro de calcio

La solución reticulante se preparó con CaCl_2 al 1N en 60 mL de agua destilada y se agitó magnéticamente en un barnstead thermolyne SP46 (Iowa, USA) por cinco minutos a 25 °C, después se aforó a 100 mL y dejó reposar por 10 minutos.

5.2.4. Incorporación de agente de control biológico en las suspensiones de alginato de sodio

El hongo *Trichoderma harzianum* a 1×10^6 UFC/g se sembró en una caja de Petri con Potato, Dextrosa, Agar (PDA) donde además se aplicó cloranfenicol (10 ml/L). Se incubaron en estufa a 26 °C por seis días, posteriormente, los microorganismos fueron recolectados en 10 mL de agua destilada. Estos se agregaron a 90 mL de la suspensión de AS incorporados magnéticamente con un barnstead thermolyne SP46 (Iowa, USA) por cinco minutos.

5.2.5. Viscosidad de los recubrimientos

La viscosidad se midió en un reómetro Anton Paar modelo MCR101 (Austria) con una geometría ST24-2D/2V/2V-30. La duración del análisis fue de dos minutos a 25 °C. La viscosidad se reportó en milipascales (mPa•s).

5.2.6. Espesor y morfología de los recubrimientos

El espesor del recubrimiento se midió con un micrómetro digital Mitutoyo modelo H-2780 (Tokio, Japón), con una sensibilidad de 0.001 mm. Se realizaron mediciones en 10 puntos diferentes del recubrimiento. La forma de los recubrimientos se observó mediante un microscopio óptico Omax modelo B005TJ5CEG a 40X. Se tomó la imagen de diferentes puntos aleatorios en cada caso.

5.2.7. Permeabilidad al vapor de agua de los recubrimientos

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó usando el método ASTM E96. Se colocaron seis mL de agua destilada (100% humedad relativa) a 25 °C en un frasco con una abertura de 5.8 cm de diámetro. El frasco fue sellado con el recubrimiento orgánico y colocado en un desecador con CaCl₂ anhidro (0% humedad relativa). El peso de las muestras se registró durante siete días en intervalos de 24 horas (Rahmani et al., 2017). Se usó la fórmula 1 para determinar la permeabilidad de las muestras.

$$PVA = \frac{(tasa\ de\ permeabilidad\ al\ vapor\ de\ agua)\ (espesor\ del\ recubrimiento)}{diferencia\ de\ presión\ entre\ las\ superficies} \quad (1)$$

5.2.8. Retención de agua en los recubrimientos

Para determinar la retención de agua de los recubrimientos, primero se obtuvo el contenido de humedad de las muestras. Los recubrimientos se secaron a 103 ± 2°C hasta peso constante y posteriormente se realizaron los cálculos según el método AOAC, 1990. Se colocaron las muestras secas en una humedad relativa simulada del 84 % con cloruro de potasio (KCl). El experimento consistió en pesar los recubrimientos cada 48 horas durante 10 días.

5.2.9. Superficie de los recubrimientos comestibles

Se obtuvieron recubrimientos comestibles en forma de discos de 60 mm de diámetro con 3 mm de espesor. Los recubrimientos fueron liofilizados a una temperatura de -50 °C con un sistema de vacío de 0,01 atm (Labconco FreeZone 2.5 modelo 230V, Kansas City, EE. UU.) durante 72 horas. Se tomó un fragmento del recubrimiento seco y se fijó con grafito para conferir propiedades eléctricas. La superficie de los recubrimientos se observó mediante un microscopio electrónico de barrido con un voltaje de 20 KV a una distancia de 10 mm (Jeol 7610F, Japón).

5.2.10. Propiedades mecánicas de los recubrimientos

Las propiedades mecánicas se analizaron utilizando el método ASTM D882-02 en un texturómetro Lloyd Instruments TA Plus (Inglaterra, Reino Unido). Equipado con pinzas mecánicas con una separación de 50 mm con una velocidad de 1 mm/s. Las muestras se cortaron en tiras de 1 x 9 cm, se midieron 10 repeticiones para expresar la media con la desviación estándar. La fuerza de tensión se determinó con la fuerza máxima de rotura y el espesor del recubrimiento. La elongación a la ruptura se expresó como porcentaje del alargamiento entre la distancia alcanzada antes de la rotura, y el módulo elástico se midió como la deformación por tensión del material (Alvarado et al., 2015; Sifuentes-Nieves et al., 2019).

5.2.11. Aplicación del recubrimiento orgánico con el agente de control biológico

Las soluciones con el agente de control biológico fueron aplicadas precosecha mediante un rociador a presión portátil marca Solo, S-20860 (Wisconsin, USA) seguida de la aplicación de la solución reticulante por el mismo medio en un lapso menor a cinco minutos. Se aplicó a 45 PSI con una boquilla de rocío en forma de abanico con un caudal de 0.006 L/s (Expósito and Pino, 2018; Kawakita et al., 2021). Este procedimiento se aplicó en tres ocasiones diferentes a lo largo del tiempo de maduración del fruto, la primera aplicación fue a las seis semanas de formación, la segunda y tercera aplicación fueron con 10 días de diferencia respectivamente entre cada una.

5.2.12. Identificación taxonómica de *Moniliophthora roreri* en mazorcas de cacao

De frutos de cacao con síntomas de moniliasis se tomaron muestras de 2 x 2 cm de la cáscara de la mazorca con los microorganismos dañinos los cuales fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% y posteriormente enjuagado en agua destilada, estas muestras fueron sembradas en PDA con cloranfenicol (10 ml/L) por siete días a 25 °C en penumbra. Posteriormente se purifico la cepa de *M. roreri* volviendo a sembrar una parte de la colonia en PDA. Las colonias fueron observadas por microscopia óptica a 40X – 100X (Omax B005TJ5CEG).

5.2.13. Identificación molecular de *Moniliophthora roreri*

5.2.13.I Extracción del ADN

Se utilizo entre 0.5 – 0.75 g de micelio de *Moniliophthora roreri* para macerar con 500 ml de buffer de extracción. Las muestras fueron agitadas en un vortex por un minuto y posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 6000 x g. El sobrenadante se incubó a 70 °C por 15 minutos. Enseguida se agregó fenol/cloroformo (1:1) en cada muestra y se centrifugaron por 10 minutos a 10000 x g. La fase acuosa fue separada y se le agregó isopropanol, esta mezcla fue conservada en congelación por 10 minutos para posteriormente centrifugarse una vez más por 10 minutos a 10000 x g. Finalmente, se adicionó TE 1X y RNAsa (Suárez-Contreras, 2005).

5.2.13.II Amplificación por PCR

Se amplificaron las regiones ribosomales utilizando los cebadores ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC y el ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG. En la Tabla 7 se muestran los componentes utilizados para un volumen final de 12.5 µl.

Tabla 7. Reactivos utilizados para la prueba PCR.

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	1.25 µl

dNTPs Mix	0.25 µl
Cebador ITS4	0.25 µl
Cebador ITS5	0.25 µl
ADN	0.5 µl
Dream Taq Polymerasa	0.0625 ml
Agua estéril	9.9375 µl
Volumen Final	12.5 µl

Para la prueba PCR se utilizó un termociclador (Techne TC-4000) con las siguientes condiciones según Suárez-Contreras (2016) con modificaciones: ciclo inicial a 94 °C por 2 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg; 60 °C por 1 min; 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 10 min. Las amplificaciones fueron sometidas a electroforesis por 40 min a 80 V (Bio-rad power basic) en un gel de agarosa al 1.5% w/v teñidas de bromuro de etidio. Las bandas únicas obtenidas fueron observadas con un fotodocumentador (bio-rad gel Doc Ez Imager).

5.2.14. Efecto del agente de control biológico sobre el fitopatógeno

El efecto de micoparasitismo del *T. harzianum* sobre *M. royeri* se evaluó según el método de cajas de Petri precolonizadas, después de la incubación se analizaron por siete días para detectar la presencia del fitopatógeno. Se empleó la Fórmula 2, para determinar el porcentaje de parasitismo.

$$\% \text{ Parasitismo} = \frac{\text{Crecimiento del antagonico}}{\text{Número de muestras extraídas}} \times 100 \quad (2)$$

La antibiosis del *T. harzianum* sobre *M. royeri* se determinó sobre cultivos pareados, para lo cual se registró el crecimiento radial hasta generar contacto con el patógeno. Se empleó la Fórmula 3, para determinar el porcentaje de antibiosis.

$$\% \text{ Antibiosis} = \left[\left(\frac{\text{Crecimiento radial control} - \text{Crecimiento radial tratamiento}}{\text{Crecimiento radial control}} \right) \right] \times 100 \quad (3)$$

El antagonismo del *T. harzianum* sobre *M. royeri* se estimó por la Fórmula 4:

$$\text{Potencial Antagónico} = \left(\frac{\% \text{ Parasitismo} + \% \text{ Antibiosis}}{2} \right) \quad (4)$$

Para determinar el efecto en la inhibición del crecimiento de *M. royeri* se usó la formula siguiente donde la referencia fue el crecimiento de la colonia control a los 5, 10 y 15 días del tratamiento como lo propone Yépez et al. (2019). Se empleó la Fórmula 5, para determinar el porcentaje de inhibición.

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\emptyset \text{ colonia control} - \emptyset \text{ la colonia tratamiento}}{\emptyset \text{ colonia control}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Las pruebas en campo se realizaron para determinar la incidencia de síntomas de moniliasis en las mazorcas de cacao, para lo cual, después de una aplicación de recubrimiento con agente de control biológico se identificó la aparición de signos de enfermedad en intervalos de 15 días comenzando en la formación de los frutos después de la floración en el tiempo de producción. Se empleó la fórmula 6, para determinar este porcentaje de incidencia.

$$\% \text{ Incidencia} = \left(\frac{\text{Número de mazorcas dañadas}}{\text{Total de mazorcas}} \right) \times 100 \quad (6)$$

5.2.15. Caracterización física de las mazorcas de cacao

El tamaño de los frutos se midió mediante los diámetros polar y ecuatorial con un calibrador vernier digital Surtek con resolución de 0,01 mm (China). El peso total de cada fruto de cacao se registró con una balanza digital Torrey L-PCR con una sensibilidad mínima de 0.005 kg (México). El color de los frutos se estableció en el espacio de color L*C*h, se utilizó un colorímetro de precisión High-Quality Colorimeter, NH-310 de 8 mm de apertura (Hong Kong). Las mediciones se realizaron en cinco puntos diferentes de la superficie de la mazorca de cacao. Los

análisis de tamaño, peso y color se realizaron en 10 mazorcas de cacao de cada árbol ubicado dentro de cada zona establecida.

El número de granos de cacao se contó manualmente de cada mazorca seleccionada. El tamaño de los granos de cacao se registró con un calibrador vernier digital Surtek con resolución de 0.01 mm (China), se midió el alto, ancho y grosor de cada grano. Se midieron diez granos de cada mazorca de cacao de cada zona establecida. Finalmente, se registró el peso de todos los granos contenidos en cada mazorca de cacao con una balanza digital Torrey L-PCR con una sensibilidad mínima de 0.005 kg (México). Para la dureza de los granos de cacao se utilizó un texturómetro Brookfield CT3 4500 (USA) utilizando una sonda TA39, se aplicó un análisis de compresión con un objetivo de 5 mm con una carga de activación de 4.5 g a una velocidad de 0.50 mm/s; Para la prueba se utilizó el software TexturePro CT V1.6 Build. Se midieron cinco granos de cada mazorca de cacao seleccionada de cada zona experimental.

5.2.16. Determinación del rendimiento de las mazorcas

El rendimiento total de las mazorcas producidas en cada zona establecida se registró de acuerdo con la Fórmula 8, basada en Ofori et al. (2020) con las siguientes modificaciones.

$$\text{Rendimiento} = (\text{Núm. de mazorcas} \times \text{Peso de las mazorcas}) / (\text{Núm. de árboles}) \quad (8)$$

Donde Núm. De árboles es el número promedio de árboles de cacao por zona estimado en 79.

5.2.17. Caracterización química de las mazorcas de cacao

De cada mazorca seleccionada de las zonas de experimentación se midió la humedad en las partes de la mazorca (método 945.15; A.O.A.C 1996). El pH mediante un potenciómetro Hanna Instruments HI 991001 (Padova, Italia). Los sólidos solubles (°Brix) se calcularon mediante un refractómetro Atago PAL-1 (China). Se cuantificó el contenido de fenoles por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. La absorbancia se midió a 760 nm expresada en mg equivalentes de ácido gálico/g (Singleton et al., 1999), los flavonoides se calcularon con la

absorbancia a 404 nm expresada como mg equivalentes de rutin/g (Oomah et al., 2005), los taninos se midieron con la absorbancia a 492 nm expresados como mg equivalentes de catequina/g (Feregrino-Pérez et al., 2008) y actividad antioxidante por DPPH y ABTS con absorbancia de 520 nm y 734 nm respectivamente ambos expresados como mg equivalentes de Trolox/g (Re et al., 1999; Zenil Lugo et al., 2014). Finalmente, se determinó el perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (Lim et al., 2010), los FAME se calcularon por comparación con un Supelco 37 Component FAME Mix estándar, se procesó la información con el software Chem-Station versión C.01.10.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Prácticas culturales precosecha

Las prácticas culturales como la poda y el aclareo son medidas preventivas y de corrección que favorecen diferentes aspectos sanitarios y ambientales, entre los beneficios se encuentran el aprovechamiento de los nutrientes del suelo por parte de las plantas de interés, minimizar los posibles puntos generadores de plagas, reduce la humedad del ambiente, incluso, mejora la ventilación general, entre otros.

La Figura 5 muestra los tres tipos de podas aplicadas en el plantío. En específico, la poda formativa es una técnica que brinda dinamismo a la plantación y aumenta la exposición a la exposición solar, la circulación del viento y el control de la humedad excesiva. Andres et al. (2016) informó sobre los efectos de la poda formativa en el control de las enfermedades y la relación con el rendimiento. La poda de mantenimiento se utiliza para eliminar ramas y brotes secundarios, esto permite que los nutrientes sean aprovechados para la floración y consolidación de frutos (Niether et al., 2018). La poda sanitaria se realizó con mayor frecuencia con el objetivo de eliminar frutos y partes del árbol dañados (Saravia-Matus et al., 2020).

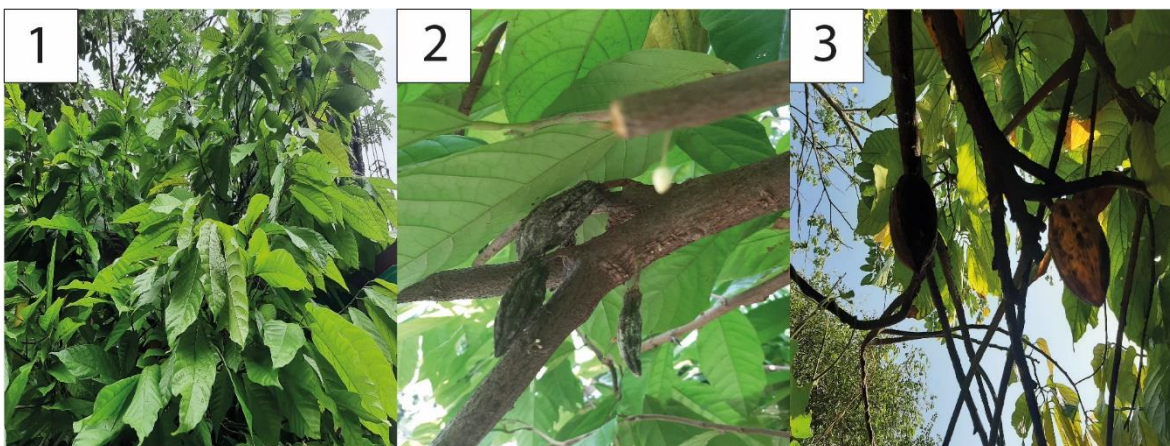


Figura 5. Aplicación de diferentes tipos de poda al árbol de cacao.

1) Poda formativa. 2) Poda de mantenimiento. 3) Poda sanitaria.

6.2. Calidad del suelo

Los resultados de la calidad del suelo denotaron una clara deficiencia de nutrientes con mayor requerimiento como N, P, K y Mg. Las deficiencias en los nutrientes del suelo de cada zona se cubrieron después del análisis inicial para comparar las características físicas de los frutos de cacao entre dos periodos de producción 2020 (antes de la fertilización) y la producción de 2021 (después de la fertilización). En la Tabla 8 se muestra el contenido de nutrientes en ambos periodos de producción, así como los valores de referencia para el cultivo de cacao. Para cubrir las necesidades nutricionales de los árboles de cacao se adicionaron 25 kg/ha de nitrógeno, 22 kg/ha de P_2O_5 , 24 kg/ha de K_2O y 4 kg/ha de magnesio según la recomendación del laboratorio de fertilización del suelo.

Tabla 8. Valores de referencia y contenido del suelo antes y después de la fertilización.

Concepto	Contenido de referencia	Contenido antes de la fertilización	Contenido después de la fertilización
pH	6.5 – 7.5	5.84 ± 0.23^a	5.82 ± 0.20^a
Materia orgánica (%)	<4.0	4.90 ± 0.45^a	5.41 ± 0.23^b

Nitrógeno (ppm)	<1300	7.85 ± 2.00 ^a	1442.50 ± 167.30 ^b
Fósforo (ppm)	<25.0	8.32 ± 4.18 ^a	115.40 ± 70.21 ^b
Potasio (ppm)	<490	41.03 ± 3.66 ^a	1362.50 ± 123.12 ^b
Calcio (ppm)	<3600	648.20 ± 45.75 ^a	4084.70 ± 273.78 ^b
Magnesio (ppm)	<480	94.40 ± 16.03 ^a	1034.40 ± 241.32 ^b
Azufre (ppm)	<5.0	3.09 ± 1.75 ^a	15.27 ± 5.96 ^b
Boro (ppm)	<1.0	1.41 ± 0.64 ^a	2.23 ± 1.24 ^a
Sodio (ppm)	<15.0	18.55 ± 6.11 ^a	25.32 ± 5.73 ^b
Zinc (ppm)	<2.2	2.79 ± 1.10 ^a	4.92 ± 1.34 ^b

Los datos se expresan como la media ± DE. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa entre las muestras por el método LSD de Fisher $p < 0,05$. Todas las pruebas se realizaron con 10 repeticiones de cada muestra. El contenido de referencia se obtuvo de (Hartemink, 2005).

Las propiedades físicas del suelo de las zonas experimentales y la zona control fueron composición de textura franco arcillosa con punto de saturación de 48.0%, capacidad de campo de 25.6%, punto de marchitez permanente de 15.2%, condición hidráulica de 4.20 cm/h y densidad aparente de 1.05 g/cm³.

Kongor et al. (2016) realizaron un estudio donde demostraron la importancia de la materia orgánica y la fertilización para obtener suelos de alta calidad. El estudio se realizó en fincas cacaoteras en Ghana, los factores determinantes fueron la cantidad de fósforo, capacidad de intercambio catiónico y nivel de pH. Debido a que la materia orgánica es un parámetro fundamental en la calidad del suelo, se ha investigado la forma de fertilizar de manera frecuente y sustentable. En este sentido, Sauvadet et al. (2020) observaron que el diseño del agroecosistema cacaotero con árboles de sombra favorece la calidad del suelo por la disponibilidad de hojarasca y la retención de agua. En contraste, el cambio climático es un factor que afecta el rendimiento en las plantaciones de cacao, específicamente, la ausencia de precipitaciones significativas. En consecuencia, la relevancia del punto de

saturación del suelo es un parámetro que se debe considerar para reducir la mortalidad de árboles y el rendimiento de frutos (Gateau-Rey et al., 2018).

6.3. Viscosidad de los recubrimientos

La viscosidad de las muestras fue determinante en el comportamiento de las propiedades del recubrimiento, las mediciones de esta propiedad se muestran en la Figura 6. La mayor viscosidad se obtuvo del tratamiento 9 con 331.25 ± 16.25 mPa·s, mientras que el menor valor se obtuvo de la muestra control con un valor de 27.74 ± 1.22 mPa·s. El comportamiento de las suspensiones se afectó por la cantidad de hidrocoloide y glicerol añadida (Giuseppe et al., 2018), de los resultados obtenidos se puede inferir que la viscosidad aumenta a mayor cantidad de glicerol con una concentración constante del hidrocoloide. Las principales alteraciones en el comportamiento de las suspensiones se debieron a diferentes factores como temperatura, pH, concentración y peso molecular (Yao et al., 2018). Los principales cambios se produjeron en las propiedades para espesar, retener agua, formación de gel y generación de película (Avendaño-Romero et al., 2013). Ramos et al. (2018) relacionaron la concentración de alginato con el aumento de la viscosidad de las suspensiones realizadas, esto afecta directamente al espesor de los recubrimientos.

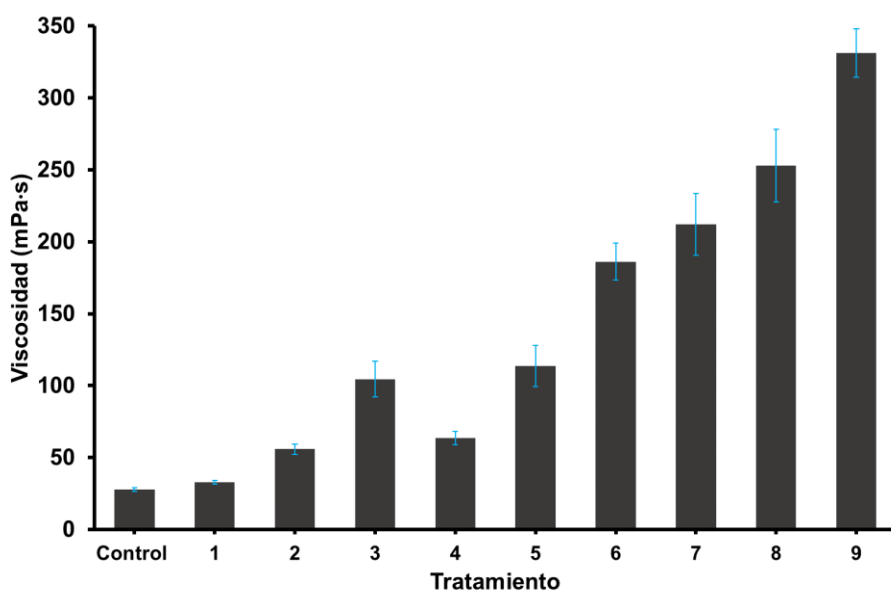


Figura 6. Análisis de la viscosidad de suspensiones de alginato y glicerol en diferentes proporciones.

Ota et al. (2018) demostraron que la combinación de alginato con otros materiales mejora las propiedades de los recubrimientos, como la viscosidad. Específicamente, su estudio con alginato-pectina mostró viscosidades de 7 - 83 mPa·s. Por el contrario, Reyes-Avalos et al. (2016) utilizaron la combinación de alginato-quitosano con una viscosidad de 2944 mPa·s, esta suspensión se utilizó para recubrir frutos por el método de inmersión.

Las viscosidades bajas se utilizan en procesos de recubrimiento principalmente en el método de aspersión, donde las propiedades que afectan su desempeño son la densidad, la tensión superficial y la viscosidad. En particular, esta última característica modifica el volumen de la suspensión y, por lo tanto, el espesor del recubrimiento (Molea et al., 2017; Khairunnisa et al., 2018).

6.4. Espesor y morfología del poro de los recubrimientos

El rango de espesor de los recubrimientos fue de 0.054 ± 0.003 - 0.083 ± 0.003 mm, como se muestra en la Tabla 9. El tratamiento uno obtuvo recubrimientos con el menor espesor en 0.0541 ± 0.0027 mm con valores de 1% alginato y 1% glicerol, el espesor aumenta a medida la cantidad de alginato y glicerol aumenta en cada tratamiento, por lo tanto, el espesor del recubrimiento nueve fue el de mayor valor con 0.0825 ± 0.0033 mm con 2% alginato y 3% glicerol. El aumento del espesor de los recubrimientos se debió a la capacidad del alginato de retener agua, lo que provoca un hinchamiento del polímero; además, la interacción del alginato con NaCl_2 provoca el cambio en la estructura entre los bloques de alginato M/G a través del intercambio iónico en el efecto “caja de huevo” (Kale et al., 2018). Incluso, (Dewi and Husni (2020) relacionaron el espesor de los recubrimientos con el material utilizado, volumen de la suspensión y las condiciones de secado como temperatura y tiempo.

El espesor de los recubrimientos de alginato-glicerol se modificó por la interacción de los factores temperatura-tiempo y la composición del recubrimiento. Sin embargo, se debe considerar el comportamiento del material en la superficie para evitar problemas estructurales tales como grietas o agujeros, en el recubrimiento de alginato-glicerol, el daño a la superficie se puede prevenir dejándolo reposar a

temperatura ambiente (25 - 30 °C) durante periodos de tiempo entre 48 y 72 horas. Por lo tanto, se puede inferir que los factores físicos provocan las propiedades de barrera y mecánicas del recubrimiento (Bagheri et al., 2019).

La morfología de los recubrimientos está dada por diferentes factores, entre ellos, la cantidad de agua libre juega un papel crucial ya que esta queda atrapada entre las capas del material, lo cual, forma una compleja estructura tridimensional que modifica el comportamiento e integridad de la superficie (Pereira et al., 2019). La observación del recubrimiento a través del microscopio mostro la forma del poro en una magnitud de 40X, se puede apreciar cualitativamente que el tamaño del poro se modifica en relación a la cantidad de glicerol en la formulación.

En la Figura 7 se muestra la forma del poro de los diferentes tratamientos de los recubrimientos comestibles a base de alginato de sodio y el control. Como se puede apreciar en las imágenes, La forma tridimensional del poro proporciona una serie de capas dentro del mismo poro, este comportamiento se repite sin importar la cantidad de glicerol. El único cambio cualitativo es el tamaño de los poros.

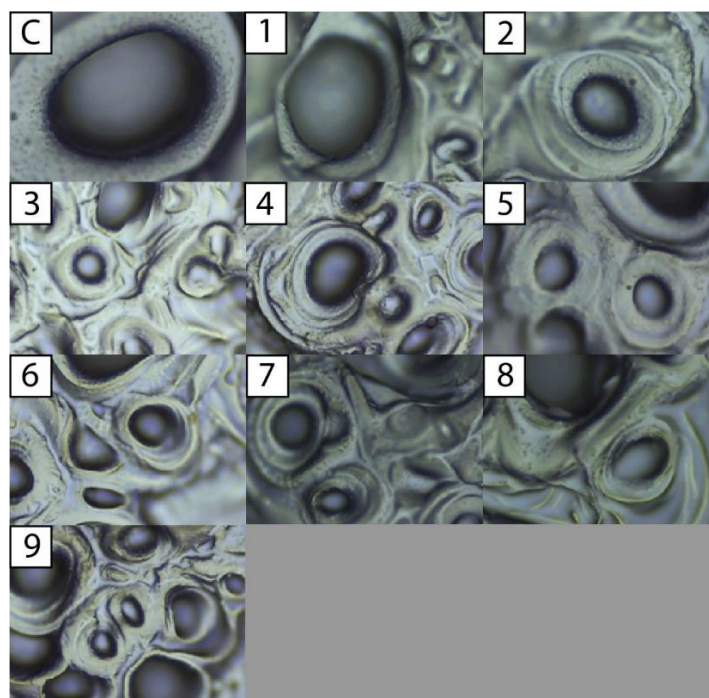


Figura 7. Morfología del poro de los recubrimientos a base de alginato de sodio y glicerol.
C: Control, los números en la esquina superior izquierda indican el número de tratamiento.

6.5. Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua se determinó en relación con la acción del plastificante, que puede modificar las propiedades de permeabilidad del recubrimiento. Los datos que determinan la barrera al intercambio de vapor se muestran en la Tabla 9. El menor valor de permeabilidad fue $4.427 \pm 4.57 \times 10^{-10}$ g/m²·s·Pa del tratamiento 9, este tratamiento tiene el mayor porcentaje de alginato-glicerol y espesor de recubrimiento. Los valores obtenidos de permeabilidad fueron similares a los obtenidos en un estudio previo bajo las mismas condiciones de humedad relativa y componentes del recubrimiento (Olivas and Barbosa-Cánovas, 2008). El aumento de la humedad disminuye la barrera de vapor entre las superficies exterior e interior; por lo tanto, hay mayor intercambio de vapor de agua. Además, un recubrimiento sin plastificante o de baja concentración da como resultado una superficie con grietas o alta porosidad, facilitando la transferencia de gases (Aadil and Jha, 2016).

Estudios recientes demostraron que los niveles bajos de permeabilidad permiten el uso de recubrimientos a base de alginato como protectores en los envases de alimentos. Giz et al. (2020) demostraron que la interacción entre alginato, glicerol y CaCl₂ en veinte composiciones evaluadas es decisiva en la permeabilidad. Se observó una disminución en los valores de permeabilidad al aumentar las concentraciones de CaCl₂ en el entrecruzamiento de los recubrimientos. Por lo tanto, las diferencias entre la permeabilidad de este estudio y las reportadas en la literatura pueden variar debido a varios factores, incluida la temperatura. Específicamente, Wang et al. (2017) obtuvieron valores de permeabilidad inferiores a los reportados en este estudio debido al uso de una base primaria de colágeno. En particular, la temperatura a la que se preparó la suspensión de colágeno-alginato influye en el espesor del recubrimiento y, por lo tanto, en la permeabilidad. Los resultados de esta investigación en relación a los datos del estudio anterior, brindan la oportunidad de optimizar recubrimientos comestibles con la combinación de diferentes tipos de compuestos como proteínas u otros polisacáridos, esto con el fin de minimizar alteraciones en el comportamiento de las propiedades de los recubrimientos.

6.6. Retención de agua en los recubrimientos

Los recubrimientos comestibles a base de alginato sometidos a una humedad relativa de 84% con cloruro de potasio presentaron un contenido de agua similar entre los diferentes grados de adición de glicerol y el control. El valor más bajo en contenido de agua fue del recubrimiento control con 4.82 ± 0.29 g al inicio de la prueba, mientras, el registro de mayor cantidad fue del tratamiento con glicerol al 3% con un valor de 5.85 ± 0.24 g.

Los resultados muestran que conforme avanza la experimentación la cantidad de agua contenida en los recubrimientos fue disminuyendo paulatinamente hasta presentar valores de 1.61 ± 0.007 g para el control y para el tratamiento con 3% de glicerol presento 2.18 ± 0.19 g, estos valores fueron el más bajo y el más alto respectivamente al termino de los 10 días que duro la experimentación con los recubrimientos.

En la Figura 8 se muestra el comportamiento del control y de los tratamientos con adición de glicerol, se puede observar la tendencia a perder el contenido de agua conforme avanzan los días de la experimentación. Los resultados estadísticos muestran que no hay diferencia entre el control y los tratamientos con glicerol al 1 y 2%. Sin embargo, existe una diferencia estadística con respecto al tratamiento con glicerol al 3%.

Este comportamiento se debe a la propiedad del glicerol como hidratante, es decir, tiene la capacidad de atraer y retener la humedad en la estructura tridimensional del recubrimiento, lo cual, mantiene por más tiempo la integridad del mismo (Basiak et al., 2018). Esta capacidad es determinante para la utilización del glicerol en la formulación de los diferentes tipos de recubrimientos orgánicos, solo es necesario considerar el tipo de material empleado para favorecer las propiedades mecánicas, la permeabilidad al vapor de agua, transmisión de gases, entre otros factores.

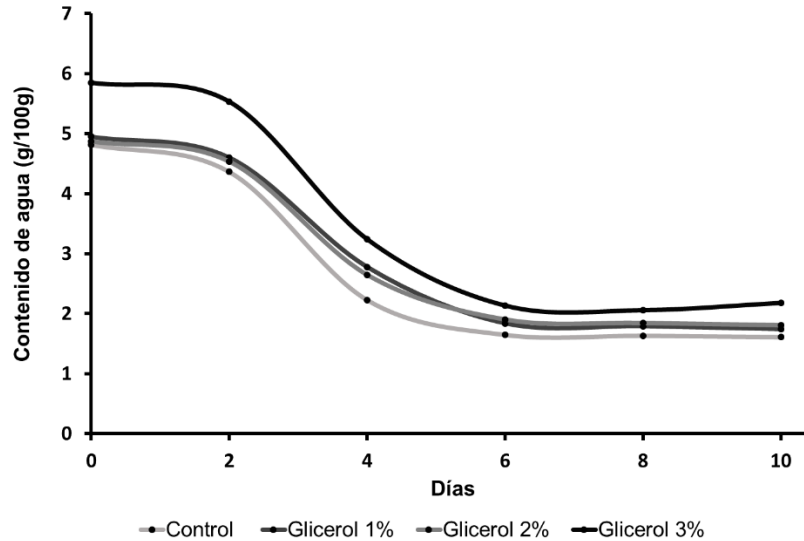


Figura 8. Contenido de humedad de los recubrimientos comestibles con glicerol a 84% de humedad relativa.

Linares-Castañeda et al. (2023) realizaron un estudio en chiles para alargar la vida útil del producto mediante un recubrimiento a base de alginato, zaína y glicerol. La adición del glicerol al 4% en este tratamiento contribuyó para mantener la calidad del chile en cuanto a pérdida de peso y firmeza. Este mismo efecto de protección se ve en otros estudios con recubrimientos comestibles a base de alginato y glicerol. Medina-Jaramillo et al. (2020) estudio como un recubrimiento de alginato, carvacrol y glicerol mejoran la vida útil de arándanos después de 21 días de almacenamiento debido a la menor tasa de respiración y pérdida del agua.

6.7. Superficie de los recubrimientos

Los recubrimientos fueron observados mediante microscopia electrónica de barridos (SEM, por sus siglas en inglés) en diferentes aumentos. La superficie del recubrimiento comestible determina la integridad de las capas, incluso, muestra la estructura tridimensional de la formación del alginato, glicerol y agua. En la Figura 9 se muestran las imágenes obtenidas del recubrimiento control y de los tratamientos con glicerol al 1, 2 y 3%.

La imagen del recubrimiento control muestra lo quebradizo de la superficie en ausencia del glicerol, en este sentido, a medida que aumenta la cantidad de glicerol la apariencia superficial se modifica en un recubrimiento liso, continuo, sin presencia

de orificios o grietas. Como ya se mencionó anteriormente, la integridad de los recubrimientos se relaciona con diferentes propiedades físicas, mecánicas y de aplicación, entre ellas, la adherencia del recubrimiento sobre el material o producto receptor.

Liu et al. (2021) realizaron un experimento con un recubrimiento para mantener la calidad postcosecha de la fresa, en este estudio, determinaron por SEM que la estructura interna y la superficie porosa permiten aumentar la capacidad de carga de moléculas funcionales. Esto demuestra la versatilidad de los recubrimientos para cumplir con múltiples finalidades, los cuales dependen del objetivo en la utilización de dichos recubrimientos orgánicos.

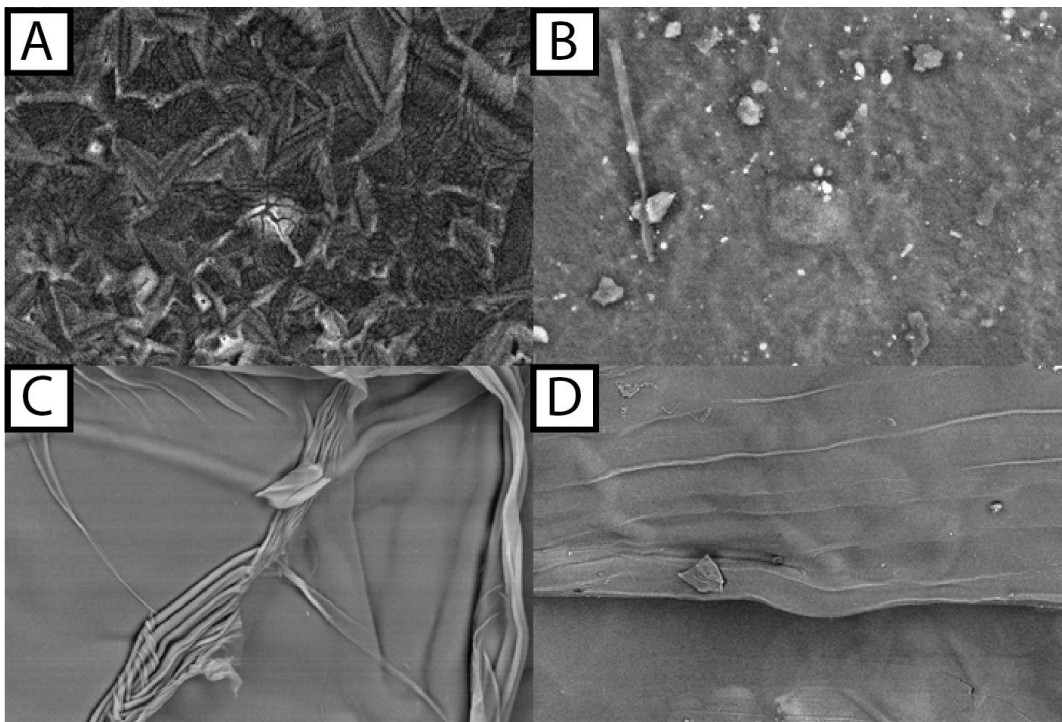


Figura 9. Imágenes SEM de los recubrimientos comestibles con diferentes adiciones de glicerol.

A: Imagen del recubrimiento control a 1500X, B: Imagen del recubrimiento con 1% de glicerol a 1000X, C: Imagen del recubrimiento con 2% de glicerol a 500X y D: Imagen del recubrimiento con 3% glicerol a 160X.

Yin et al. (2019) realizaron un estudio con un recubrimiento comestible a base de alginato sobre la cáscara del mango, los resultados obtenidos mostraron una

superficie sin presencia de orificios, además, la adherencia del material fue evidente con respecto a la epidermis del fruto. Estos mismos resultados se presentaron en un estudio para alargar la vida útil de productos postcosecha donde la muestra control no presentó cambios con respecto a los demás tratamientos. Es decir, se presentó una superficie homogénea sin grietas ni alteraciones (Ramakrishnan et al., 2023).

6.8. Propiedades mecánicas de los recubrimientos

Se evaluaron las propiedades mecánicas para determinar la integridad del recubrimiento, el cual puede ser aplicado en diferentes etapas del cultivo de productos frescos. La fuerza de tensión, el porcentaje de elongación a la ruptura y el módulo de elasticidad de las muestras se muestran en la Tabla 9. Para la fuerza de tensión, el rango obtenido de las muestras fue de $12.66 \pm 0.94 - 25.43 \pm 2.538$ MPa. El tratamiento uno obtuvo recubrimientos con la mayor fuerza de tensión a 25.43 ± 2.538 MPa con valores de 1% alginato y 1% glicerol, la fuerza de tensión disminuye a medida que aumenta la cantidad de glicerol en cada tratamiento.

El tratamiento uno obtuvo recubrimientos con la menor elongación a la ruptura de 17.31 ± 0.727 % con valores de 1 % alginato y 1 % de glicerol, la elongación a la ruptura aumenta a medida que aumenta la cantidad de glicerol en cada tratamiento hasta un máximo obtenido del tratamiento nueve con 27.94 ± 0.377 %.

Finalmente, el módulo de elasticidad se expresó en un rango de $883 \pm 53.95 - 1798 \pm 25.00$ MPa. El tratamiento uno obtuvo recubrimientos con la mayor resistencia con 1798 ± 25.00 MPa con valores de 1% alginato y 1% glicerol, el módulo de elasticidad disminuye a medida que aumenta la cantidad de glicerol y alginato con cada tratamiento. En general, el componente principal del recubrimiento que modifica estas propiedades es el glicerol, el cual reduce las fuerzas intermoleculares del alginato, mejorando estas propiedades para una mayor integridad (Barbut and Harper, 2019).

Hidayati et al. (2021) realizaron un estudio con glicerol y CMC obteniendo una fuerza de tensión de 101.341 MPa con cantidades de 0.25% de glicerol y 1% de CMC; la

diferencia de hidrocoloides utilizados es la principal causa de la discrepancia en los valores, sin embargo, el comportamiento de fuerza de tensión es similar debido al uso de glicerol donde la concentración del plastificante determina la fuerza utilizada. Prus-Walendziak and Kozłowska (2021) realizaron un estudio con diferentes bases de recubrimiento y concentración de glicerol, el tratamiento 1% ALG/GEL/G obtuvo los valores más bajos de elongación a la ruptura con $4,8 \pm 0,8\%$ en contraste, el tratamiento 10% ALG/GEL/G obtuvo valores de $173,0 \pm 7,4\%$. La investigación realizada mostró la misma tendencia de aumento de elongación a la ruptura a medida que aumentaban los espesantes y plastificantes como en la investigación antes mencionada.

Un estudio enfocado en el efecto del glicerol en la elasticidad de los recubrimientos reportó que la cantidad añadida disminuye la fuerza aplicada, por lo tanto, el tratamiento con 0% de glicerol obtuvo 2034 ± 548 MPa mientras que el tratamiento con 30% de glicerol reportó 632 ± 316 MPa (Giz et al., 2020). Los datos obtenidos de esta investigación son similares en cuanto al comportamiento del glicerol, sin embargo, el hidrocoloide utilizado cambia este tipo de interacción.

En otros estudios se ha reportado que las propiedades mecánicas, específicamente, la fuerza de tensión y el módulo de elasticidad aumentan a altas concentraciones de CaCl_2 , mientras que la elongación a la ruptura disminuye en las mismas condiciones (Costa et al., 2018). Incluso la combinación de materiales utilizados es otro factor importante en los cambios en las propiedades mecánicas (Salama et al., 2019).

Tabla 9. Evaluación de las propiedades físicas y mecánicas de recubrimientos.

Tratamiento	Espesor* (mm)	Permeabilidad al vapor de agua ($\times 10^{-10}$ g/m ² s Pa)	Fuerza de tensión (MPa)	Elongación a la ruptura (%)	Módulo de elasticidad (MPa)
1	0.0541 \pm 0.0027 ^a	8.5976 \pm 4.579 ^a	25.43 \pm 2.538 ^a	17.31 \pm 0.727 ^a	1798.00 \pm 25.00 ^a
2	0.0637 \pm 0.0025 ^b	8.5823 \pm 4.992 ^a	24.58 \pm 0.866 ^a	17.86 \pm 0.803 ^{ab}	1540.00 \pm 42.93 ^b
3	0.0697 \pm 0.0024 ^c	8.3623 \pm 3.501 ^{ab}	24.08 \pm 1.292 ^a	18.70 \pm 0.625 ^b	1404.00 \pm 53.03 ^c
4	0.0659 \pm 0.0026 ^b	7.8026 \pm 2.892 ^{bc}	21.28 \pm 1.089 ^b	20.77 \pm 0.846 ^c	1213.33 \pm 59.94 ^d
5	0.0687 \pm 0.0029 ^c	7.4682 \pm 6.669 ^{cd}	20.48 \pm 1.376 ^b	22.50 \pm 0.555 ^d	1115.67 \pm 58.23 ^{de}
6	0.0749 \pm 0.0031 ^d	6.9058 \pm 1.751 ^d	19.33 \pm 1.267 ^b	24.15 \pm 0.667 ^f	998.67 \pm 53.72 ^f
7	0.0761 \pm 0.0019 ^d	5.6198 \pm 1.443 ^e	16.59 \pm 1.130 ^c	22.73 \pm 0.945 ^{de}	1191.67 \pm 92.52 ^d
8	0.0785 \pm 0.0210 ^e	5.0354 \pm 6.122 ^{ef}	14.13 \pm 0.710 ^d	24.02 \pm 1.358 ^{ef}	1034.00 \pm 64.63 ^{ef}
9	0.0825 \pm 0.0033 ^f	4.4268 \pm 2.677 ^f	12.66 \pm 0.940 ^d	27.94 \pm 0.377 ^g	882.67 \pm 53.95 ^g

Los datos se expresan como la media \pm DE. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa entre las muestras por el método LSD de Fisher $p < 0,05$.

*Esta prueba se realizó con 10 repeticiones de cada muestra, para el resto de pruebas se realizaron 3 repeticiones por muestra.

6.9. Aplicación del recubrimiento en condiciones ambientales

La primera aplicación del recubrimiento orgánico a base de alginato se rocío a 5 cm de distancia del fruto en un ángulo de 30° sin obstrucciones directas por 10 segundos en un giro de 360°. La superficie presentó acumulaciones del recubrimiento en forma de gotas debido a la cercanía del rociador con el fruto, la aplicación se realizó a 30 mazorcas de cacao con la misma respuesta en la superficie. Las condiciones del ambiente para el 09 de octubre de 2022 durante la aplicación a las 12:00 horas fueron 24.5°C de temperatura con una humedad relativa de 82%.

La segunda aplicación se realizó a 10 cm de distancia del fruto por el mismo ángulo y tiempo. El resultado fue una superficie con acumulaciones de menor tamaño en los camellones del fruto, sin embargo, en los surcos se presentaron gotas del material de forma continua. Las condiciones ambientales para el 30 de octubre de 2022 durante la aplicación a las 12:00 horas fueron 22.4°C de temperatura con una humedad relativa de 81%.

La tercera aplicación se realizó a 10 cm de distancia del fruto a un ángulo de 45° sin obstrucciones directas por 10 segundos en un giro completo. El fruto no presentó acumulaciones en el camellón o surco, no obstante, el 10% de los frutos recubiertos presentaron una gota de material en la punta del diámetro polar. Las condiciones ambientales para el 13 de noviembre de 2022 durante la aplicación a las 12:00 horas fueron 21.1°C de temperatura con una humedad relativa del 77%. En la Figura 10 se muestra las aplicaciones del recubrimiento y los efectos visuales mencionados con la acumulación del material.



Figura 10. Aplicaciones del recubrimiento en condiciones ambientales.

1) Primera aplicación, 2) Segunda aplicación, 3) Tercera aplicación

6.10. Cultivo e identificación taxonómica de *Moniliophthora roreri*

Las muestras recolectadas del campo fueron inoculadas para observar el tipo de microorganismos presentes en la superficie de la mazorca de cacao. Este proceso permitió observar el tipo de crecimiento de *Moniliophthora roreri*, el cual es un crecimiento lento en comparación con el agente de control biológico. En la Figura 11 se muestra el proceso desde la recolección de las muestras en campo hasta la purificación de la cepa.

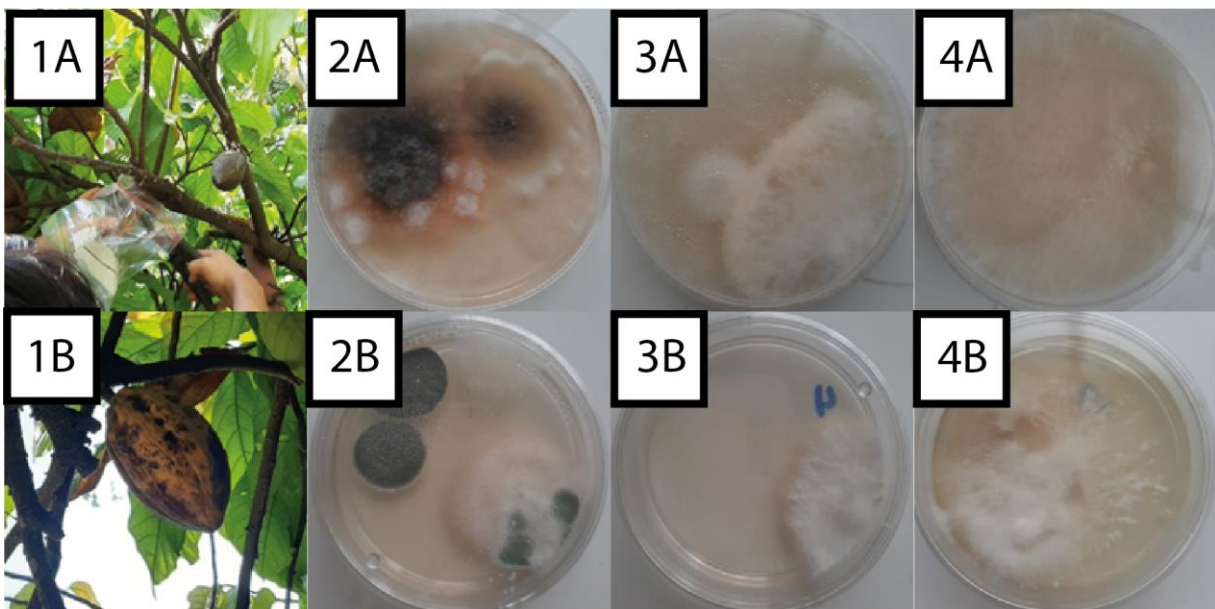


Figura 11. Cultivo e identificación de *Moniliophthora roreri*.

1A) Recolección en campo 2021, 2A) Cultivo de la superficie 2021, 3A) Aislamiento del microorganismo 2021, 4A) Purificación del microorganismo 2021. 1B) Recolección en campo 2022, 2B) Cultivo de la superficie 2022, 3B) Aislamiento del microorganismo 2022, 4B) Purificación del microorganismo 2022.

Una muestra de la colonia de la cepa purificada fue colocada sobre un portaobjetos y observado bajo el microscopio. La identificación inicial se realizó mediante fichas taxonómicas, las cuales establecen a *Moniliophthora roreri* como un basidiomiceto con un micelio hialino, ramificado y septado con doliporas. Los conidios se producen en cadenas con maduración basipetal que comprenden de 4 a 10 en serie y están envueltos en una pared celular. Las esporas son globosas y en ocasiones elipsoidales. En la Figura 12 se muestra las cepas purificadas que mostraron una semejanza con la descripción taxonómica antes mencionada.

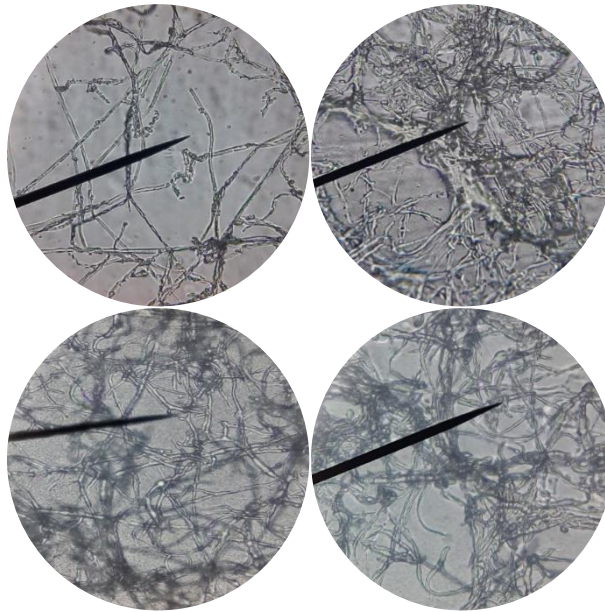


Figura 12. Identificación por fichas taxonómicas en microscopía óptica a 40X.

6.11. Identificación por PCR de *Moniliophthora roreri*

Se obtuvieron 13 muestras de *M. roreri*, los amplicones obtenidos estuvieron en el rango de 750 pb. Estos valores corresponden a los establecidos para este hongo. Suárez-Contreras (2016) analizó 56 aislamientos de *M. roreri* de los cuales 8 tuvieron 600 pb, 12 presentaron 740 pb y los restantes 36 mostraron 750 pb. Los resultados muestran una concordancia entre las muestras de los hongos de nuestro estudio y la mayoría de las muestras del estudio mencionado. Este mismo resultado lo obtuvo Guato-Molina et al. (2019) al observar muestras con 750 pb para *M. roreri*.

En la Figura 13, se observan las cepas de *M. roreri* para cada zona experimental y control. En la imagen se muestra el comportamiento de cada cepa de *M. roreri* de las diferentes zonas experimentales que presentaron indicadores de moniliasis, como resultado se obtuvieron bandas similares entre cada muestra. Dichas bandas se encuentran ubicadas en el rango de los 750 pb comparadas contra la escalera obtenida como referencia.

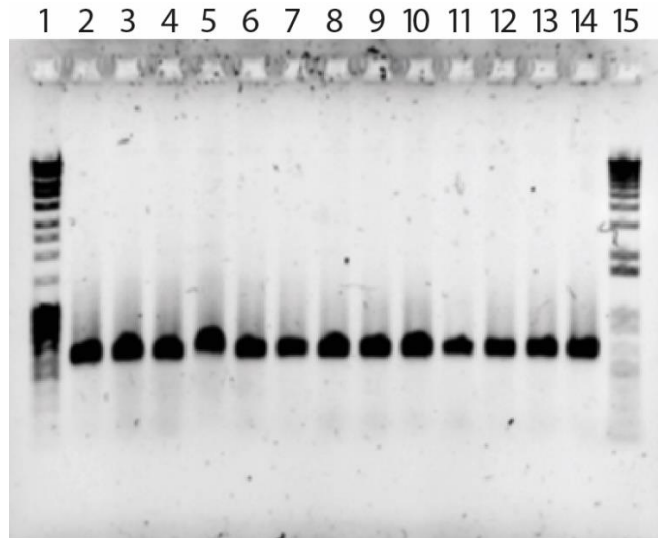


Figura 13. Amplificación por PCR de cepas de *Moniliophthora roreri*.

Del carril 2 al 4 se analizaron muestras de la zona tratamiento 1, del carril 5 al 7 se presentan muestras de la zona tratamiento 2, del carril 8 al 10 se colocaron las muestras de la zona tratamiento 3, finalmente, del carril 11 al 14 se observan las muestras de la zona control. En el carril 1 y 15 se muestran las escaleras que indican el peso molecular.

6.12. Efecto del agente de control biológico sobre *Moniliophthora roreri*

El análisis en condiciones de laboratorio del efecto del control biológico sobre *M. roreri* mostro un efecto parasitario del $73\% \pm 4.66$, antibiosis de $34.02\% \pm 3.46$, potencial antagónico de $53.46\% \pm 2.97$ y un efecto inhibidor del $27.39\% \pm 2.97$. Esto demuestra que el *trichoderma harzianum* es un antagonista viable en el tratamiento correctivo y preventivo para evitar el desarrollo de moniliasis en mazorcas de cacao.

El género *Trichoderma* posee una alta eficiencia en la actividad de control. Leiva et al. (2020) muestran un claro efecto de control de diferentes cepas de *Trichoderma*

en Perú, en su estudio, se obtuvieron valores parasitarios desde 32 ± 13.6 hasta 100%, antibiosis de 33.36 ± 1.13 hasta $57.92 \pm 4.43\%$ y potencial antagónico de 42.36 ± 6.69 hasta $78.64 \pm 0.73\%$. El estudio concluye que existe una relación en la actividad antagónica entre especies que crecen en un mismo sitio. Por lo tanto, las especies parasitarias más efectivas son las presentes en el mismo agroecosistema.

En la Figura 14 se muestra la confrontación a nivel laboratorio de las cepas de *M. roreri* y *Trichoderma harzianum*, en la imagen se puede apreciar la interacción entre los microorganismos. En ambos casos, la confrontación generó un campo de inhibición el cual permaneció intacto a lo largo de la experimentación. El *Trichoderma harzianum* mostró ser una barrera efectiva para el crecimiento de *M. roreri*. Este efecto se presentó en una proporción 1:1.

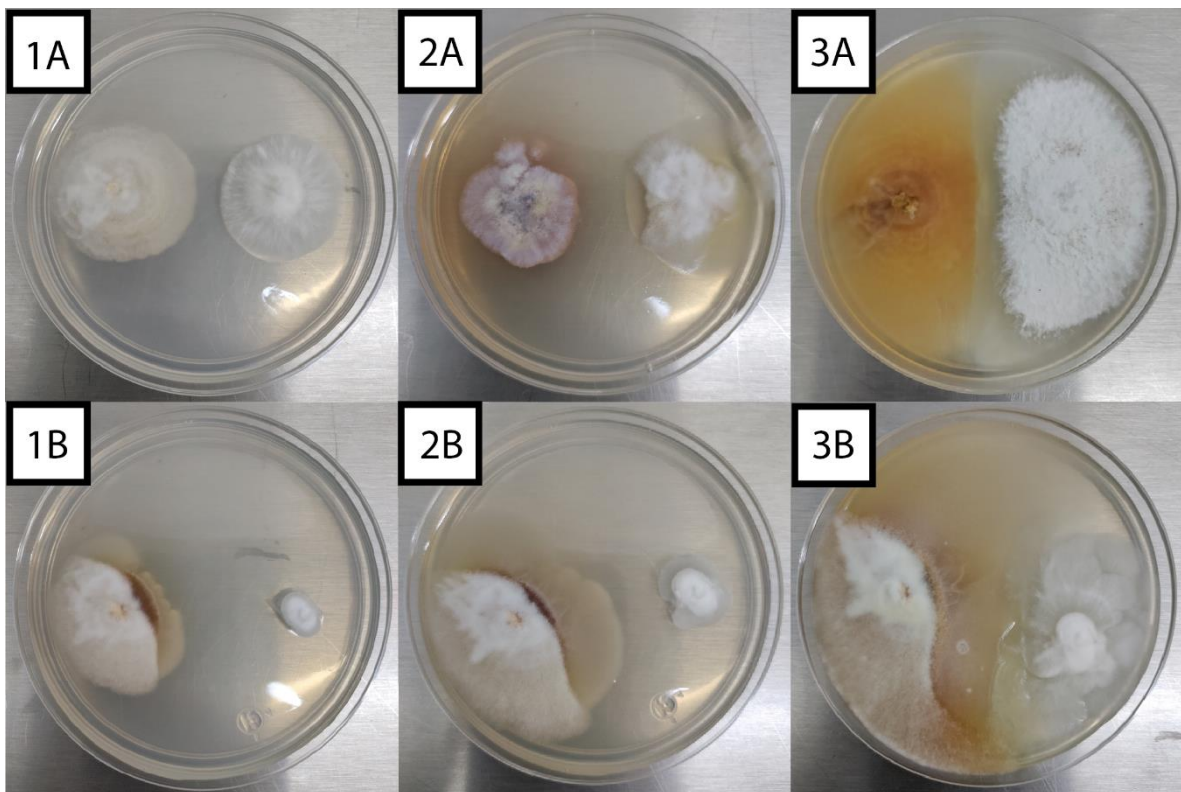


Figura 14. Confrontación antagónica entre *Trichoderma harzianum* y *Moniliophthora roreri* a nivel laboratorio.

A) Confrontación de *Trichoderma harzianum* y *Moniliophthora roreri* en la temporada mayor 2021, B) Confrontación de *Trichoderma harzianum* y *Moniliophthora roreri* en la temporada mayor 2022

Posteriormente, Leiva et al. (2022) reportaron la actividad antagónica general del clado filogenético *harzianum*. Se reportó el parasitismo en un rango de 30 – 100%, antibiosis de 12 – 25% y potencial antagónico de 30 – 50%. Los datos de nuestro estudio son mayores para antibiosis y potencial antagónico, mientras, en parasitismo el valor se encuentra dentro del rango reportado en el estudio anterior. El efecto de control es variable incluso entre las mismas cepas de hongo, se debe a la producción de enzimas que degradan la pared celular del fitopatógeno (Vinale et al., 2006).

López-López et al. (2022) mencionan que existen mecanismos de inhibición como el hiperparasitismo y la formación de halos de inhibición. En su estudio analizaron 25 cepas de *Trichoderma*, de estas cepas 11 inhibieron el crecimiento con la formación de halos, mientras, el número restante de cepas presentaron hiperparasitismo sobre el fitopatógeno. El *Trichoderma* presentó un porcentaje promedio de inhibición del 80%, este valor difiere de nuestros datos principalmente por el tipo de fitopatógeno estudiando y el tipo de *Trichoderma* empleado, incluso, el origen de los microorganismos antagónico y fitopatógeno influye en la efectividad del sistema de control.

6.13. Caracterización física de las mazorcas de cacao

Las características físicas de los frutos están directamente asociadas con el desarrollo y la maduración. La Tabla 10 muestra las medidas físicas de la mazorca y los granos de cacao del grupo control y de las tres áreas experimentales. Las mazorcas de cacao en las áreas experimentales midieron 109.87 ± 8.62 a 129.78 ± 8.33 mm de largo, 69.50 ± 5.96 a 77.96 ± 3.67 mm de ancho, 249.93 ± 28.76 a 289.64 ± 42.96 g de peso y 39 a 40 granos de cacao por mazorca.

Los frutos presentaron una coloración amarilla expresada en el espacio de color L*C*h: 29.47 ± 4.7 a 39.19 ± 3.48 , 19.46 ± 6.82 a 39.84 ± 2.7 y 59.42 ± 3.08 a 75.68 ± 24.82 respectivamente. Los granos de cacao midieron 15.84 ± 1.99 a 19.15 ± 1.07 mm de largo, 11.05 ± 0.95 a 13.15 ± 0.88 mm de ancho, 6.14 ± 0.68 a 7.81 ± 1.32 mm de espesor, 68.87 ± 4.36 a 78.94 ± 5.43 g de peso y una dureza del grano de 751.90 ± 197.43 a 963.35 ± 173.33 g.

Sitohang and Siahaan (2018) analizaron el tamaño de la mazorca y la cantidad de granos de cacao en diferentes altitudes en el norte de Sumatra. Los resultados obtenidos a una altitud de 280 m (similar a la de nuestro estudio) fueron 181.1 mm de largo, 78.6 mm de ancho y 489.50 g de peso, mientras que el número de granos fue de 36 por fruto.

Las mazorcas analizadas del norte de Sumatra obtuvieron valores más altos en cuanto a tamaño y peso de la mazorca, sin embargo, presentaron menor número de granos con respecto a los frutos de nuestro estudio. En otro estudio se analizó el color como indicador de madurez, registrándose valores de $^{\circ}\text{C}$ 50.43 ± 6.90 y $^{\circ}\text{h}$ 77.42 ± 7.50 para frutos de cacao con tonalidades amarillas, en este estudio los autores concluyen que el color cambia conforme avanza la madurez del fruto (Cubillos Bojacá et al., 2019).

6.14. Rendimiento de las mazorcas de cacao

El rendimiento del cacao estuvo influenciado por la fertilización del suelo y la aplicación de técnicas de manejo previas a la cosecha. La Tabla 10 muestra la cantidad total de mazorcas de cacao obtenidas de una hectárea. El mayor rendimiento se obtuvo de la zona experimental 2 con 520.06 ± 104.91 kg, sin embargo, no existe diferencia estadística con respecto a las otras dos zonas de cultivo. Entre las zonas de cultivo y el control hay una diferencia estadística, se debió a que el rendimiento aumentó más del 60%.

Djuideu et al. (2021) analizaron el aumento del rendimiento en diferentes tipos de agrosistemas de cacao (rústico, intermedio y pleno sol) a través de prácticas de manejo como la poda de rehabilitación, estimaron que el sistema con mayor mejora después de la poda fue el sistema intermedio con 167% de aumento. Además, se redujo la incidencia de enfermedades y plagas.

En otro estudio se planteó la importancia de promover la implementación de prácticas previas a la cosecha en fincas de cacao de pequeña escala con la intención de aumentar el rendimiento de frutos. Como resultado obtuvieron que la mayoría de los pequeños productores del sur de Indonesia no cuentan con los

conocimientos y herramientas básicos para atender las plantaciones desde el inicio y primeros años de producción (Schaad and Fromm, 2018).

Tabla 10. Propiedades físicas y rendimiento de las mazorcas de cacao de cada zona establecida.

Concepto	Control	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Frutos de cacao tratados
Tamaño (mm)					
Largo	110.32 ± 8.12 ^a	129.78 ± 8.33 ^b	119.70 ± 6.60 ^c	121.41 ± 5.60 ^c	109.87 ± 8.62 ^a
Ancho	71.03 ± 4.28 ^{ab}	77.96 ± 3.67 ^d	74.06 ± 3.26 ^{bc}	75.79 ± 3.40 ^{cd}	69.50 ± 5.96 ^a
Peso mazorca (g)	260.75 ± 29.74 ^{ab}	289.64 ± 42.96 ^b	285.39 ± 33.86 ^b	268.39 ± 31.15 ^{ab}	249.93 ± 28.76 ^a
Color					
L	38.77 ± 3.18 ^a	39.19 ± 3.48 ^a	35.58 ± 3.89 ^a	29.47 ± 4.70 ^b	35.44 ± 7.34 ^a
*C	38.31 ± 2.54 ^{cd}	39.84 ± 2.70 ^d	34.96 ± 3.67 ^{bc}	33.66 ± 5.21 ^b	19.46 ± 6.82 ^a
*h	64.03 ± 3.48 ^a	64.80 ± 3.83 ^{ab}	66.91 ± 5.99 ^{ab}	59.42 ± 3.08 ^a	75.68 ± 24.82 ^b
Núm. Granos	39 ± 3.12 ^a	39 ± 2.87 ^a	40 ± 4.30 ^a	39 ± 2.76 ^a	39.30 ± 1.19 ^a
Tamaño grano (mm)					
Largo	16.85 ± 1.49 ^a	18.60 ± 0.79 ^b	19.15 ± 1.07 ^b	18.46 ± 0.44 ^b	15.84 ± 1.99 ^a
Ancho	11.15 ± 0.90 ^a	12.41 ± 0.52 ^{bc}	13.15 ± 0.88 ^c	12.35 ± 0.70 ^b	11.05 ± 0.95 ^a
Grosor	6.61 ± 0.39 ^{ab}	7.37 ± 0.79 ^{bc}	7.81 ± 1.32 ^c	7.39 ± 1.24 ^{bc}	6.14 ± 0.68 ^a
Peso grano (g)	69.38 ± 5.46 ^a	75.84 ± 8.19 ^{ab}	78.94 ± 5.43 ^b	73.88 ± 9.20 ^{ab}	68.87 ± 4.36 ^a
Dureza grano (g)	963.35 ± 173.33 ^b	872.50 ± 202.63 ^{ab}	751.90 ± 197.43 ^a	838.75 ± 134.89 ^{ab}	754.58 ± 149.98 ^a
Núm. frutos/árbol	14.7 ± 2.31 ^a	21.5 ± 2.46 ^b	23 ± 3.30 ^b	22.4 ± 2.27 ^b	17 ± 3.10 ^a
Rendimiento (kg)	304.74 ± 68.35 ^a	491.95 ± 94.67 ^b	520.06 ± 104.91 ^b	472.36 ± 52.01 ^b	332.60 ± 58.02 ^c

Los datos se expresan como la media ± DE. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa entre las muestras por el método LSD de Fisher $p < 0,05$.

Todas las pruebas se realizaron con 3 repeticiones de cada muestra.

La Figura 15 muestra las diferencias entre el control y las áreas de cultivo fertilizadas. Existen diferentes indicadores para determinar el aumento del rendimiento de la planta, el primero es la reducción de mazorcas enfermas o laceradas. Asimismo, las flores se consolidaron en frutos viables y en desarrollo, por lo tanto, aumento los frutos formados que alcanzan el punto de madurez ideal para la cosecha.



Figura 15. Aumento de rendimiento y consolidación de frutos en las dos etapas de fructificación.

1a) Frutos de cacao formados en el tronco principal, septiembre de 2020. 2a) Flores de cacao que no lograron consolidar un fruto, septiembre de 2020. 3a) Momificación de frutos en estado avanzado de desarrollo, septiembre de 2020. 1b) Frutos de cacao formados en el tronco principal tronco, septiembre de 2021. 2b) Flores de cacao aun visiblemente viables para consolidar el fruto, septiembre de 2021. 3b) Disminución del número de frutos de cacao momificados en un estado avanzado de desarrollo, septiembre de 2021.

6.15. Caracterización química de las mazorcas de cacao

Se determinaron los compuestos químicos de cada parte de la mazorca de cacao. En La Tabla 11 se muestra el resumen del contenido de compuestos químicos presentes en las diferentes partes de la mazorca de cacao. El mucilago de cacao conocido en forma general como la pulpa es la parte más húmeda del fruto en

general. Mientras, el grano es la parte con menor cantidad de humedad. Los sólidos solubles se encuentran en mayor concentración en la parte mucilaginoso. Se puede observar que la cáscara exterior del cacao es la parte con mayor contenido en taninos, compuestos fenólicos y flavonoides. La actividad antioxidante por ABTS se muestra en rangos de $5.43 \pm 0.68 - 29.06 \pm 3.70 \mu\text{M Trolox/g}$ y por medio de DPPH se muestran en $5.63 \pm 1.15 - 32.13 \pm 1.55 \mu\text{M Trolox/g}$ para los frutos de cacao sanos.

En general, se puede comparar el contenido de los compuestos químicos de las diferentes partes del cacao en frutos sanos y frutos tratados con el recubrimiento comestible después de la infección por *M. royeri*. Cada concepto analizado fue diferente estadísticamente con excepción del contenido de sólidos solubles en la cáscara del cacao. Es decir, tanto en los frutos sanos como en los frutos tratados el contenido de sólidos solubles fue similar. Los datos muestran que, aunque todavía se encuentran los compuestos presentes en las mazorcas de cacao tratadas, la proporción se vio alterada.

En específico, los frutos de cacao tratados aumentaron en contenido de humedad, lo cual afecta directamente la dureza de los frutos y la integridad de los recubrimientos utilizados. Para el resto de los conceptos los valores disminuyeron alterando de forma gradual la cantidad y calidad de los compuestos químicos presentes.

Tabla 11. Compuestos químicos de las mazorcas de cacao.

Concepto	Frutos de cacao sanos			Frutos de cacao tratados		
	Grano	Mucílago	Cáscara	Grano	Mucílago	Cáscara
Humedad (g/100g)	4.46 ± 0.37^a	84.6 ± 0.87^b	9.13 ± 0.79^c	8.57 ± 1.06^d	87.27 ± 1.75^e	13.05 ± 2.59^f
pH	5.37 ± 0.27^a	4.89 ± 0.29^b	5.75 ± 0.25^c	4.67 ± 0.43^d	4.07 ± 0.21^e	4.92 ± 0.25^f
Sólidos solubles (°B)	16.55 ± 0.55^a	18.50 ± 1.03^b	7.69 ± 0.58^c	12.68 ± 0.90^d	12.65 ± 0.59^e	7.24 ± 0.62^c
Taninos (mg Cat/g)	14.45 ± 0.58^a	7.76 ± 1.52^b	19.66 ± 0.73^c	9.60 ± 0.76^d	3.20 ± 1.13^e	13.84 ± 2.35^f

Compuestos fenólicos (mg EAG/g)	37.44 ± 2.11 ^a	19.52 ± 1.74 ^b	64.36 ± 7.40 ^c	30.28 ± 1.91 ^d	11.82 ± 1.14 ^e	36.22 ± 4.31 ^f
Flavonoides (mg rutin/g)	13.90 ± 2.10 ^a	11.72 ± 1.27 ^b	15.64 ± 0.97 ^c	8.76 ± 1.11 ^d	8.34 ± 1.09 ^e	10.30 ± 1.68 ^f
ABTS (µM Trolox/g)	19.53 ± 1.20 ^a	5.43 ± 0.68 ^b	29.06 ± 3.70 ^c	11.27 ± 1.66 ^d	2.03 ± 0.60 ^e	15.33 ± 1.36 ^f
DPPH (µM Trolox/g)	20.13 ± 1.58 ^a	5.63 ± 1.15 ^b	32.13 ± 1.55 ^c	14.73 ± 0.90 ^d	1.60 ± 0.62 ^e	24.73 ± 1.96 ^f

g: gramos; mg: miligramos; Cat.: catequina; EAG: equivalentes de ácido gálico. Los datos se expresan como la media ± DE. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa entre las muestras por el método LSD de Fisher $p < 0,05$.

En recientes investigaciones, Agudelo et al. (2022) han determinado que los compuestos químicos presentes en el fruto de cacao se pueden ver afectados por diferentes factores como el origen geográfico, las condiciones de cosecha, incluso por el año o temporalidad. Estas afirmaciones, crean la interrogante sobre la relación de la infección del patógeno *M. royeri* y la pérdida en los valores de los compuestos químicos.

De igual forma, se analizaron los ácidos grasos presentes en los frutos de cacao sanos como en los frutos de cacao infectados y posteriormente tratados con el recubrimiento comestible. Los ácidos grasos presentes en las diferentes partes del fruto de cacao fueron ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, α -linolénico, araquídico y behénico. Se encontraron otros ácidos en menor cantidad, los cuales no fueron considerados en esta investigación. En la Tabla 12 se muestra la cantidad de ácidos grasos presentes en las diferentes partes de las mazorcas de cacao.

En general, el contenido de ácidos grasos se puede comparar entre ambos estados de los frutos de cacao, el contenido de los ácidos grasos C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 fueron estadísticamente similar con respecto a su contraparte de estado fitosanitario. Sin embargo, los ácidos grasos C18:3, C20:0 y C22:0 presentaron diferencia estadística en los valores de las diferentes partes del fruto, especialmente en el mucílago y el grano.

Tabla 12. Perfil de ácidos grasos presentes en las mazorcas de cacao.

Ácido graso	Frutos de cacao sano			Frutos de cacao tratados		
	Mucílago	Grano	Cáscara	Mucílago	Grano	Cáscara
C16:0	24.77 ± 3.41 ^a	25.83 ± 4.82 ^b	21.57 ± 0.97 ^c	24.03 ± 1.27 ^a	25.27 ± 2.93 ^b	17.90 ± 1.95 ^c
C18:0	34.37 ± 1.15 ^a	34.73 ± 2.01 ^b	43.53 ± 0.65 ^c	34.63 ± 1.02 ^a	34.13 ± 2.03 ^b	41.27 ± 0.81 ^c
C18:1	34.27 ± 0.80 ^a	34.77 ± 1.30 ^b	32.67 ± 0.86 ^c	35.10 ± 1.47 ^a	33.0 ± 0.56 ^b	31.73 ± 1.07 ^c
C18:2	3.06 ± 0.51 ^a	2.83 ± 0.59 ^b	2.53 ± 0.35 ^c	3.13 ± 0.21 ^a	2.30 ± 0.20 ^b	2.20 ± 0.10 ^c
C18:3	2.66 ± 0.14 ^a	0.14 ± 0.02 ^b	0.91 ± 0.02 ^c	0.25 ± 0.04 ^d	0.79 ± 0.08 ^e	0.50 ± 0.40 ^f
C20:0	0.86 ± 0.07 ^a	2.17 ± 0.15 ^b	1.80 ± 0.20 ^c	0.53 ± 0.07 ^a	1.43 ± 0.15 ^d	1.53 ± 0.40 ^c
C22:0	1.12 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.02 ^b	1.37 ± 0.12 ^c	0.12 ± 0.03 ^d	0.12 ± 0.03 ^b	1.27 ± 0.15 ^c

Los datos se expresan como la media ± DE. Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa entre las muestras por el método LSD de Fisher $p < 0,05$.

Los frutos de cacao son un producto de altos requerimientos para su correcto crecimiento y, por lo tanto, para su aprovechamiento total. Este cultivo enfrenta diferentes desafíos tanto de proceso como biológicos. El factor más devastador en cuestión biológica son las plagas y las enfermedades. Diferentes organismos afectan este árbol en general, los microorganismos afectan las propiedades físicas y químicas de los frutos, lo cual, merma el rendimiento y el beneficio de cada parte de la mazorca.

En este sentido, recientes investigaciones se centran en buscar alternativas para minimizar o controlar los factores que afectan la calidad del fruto de cacao, en específico, las amenazas biológicas que afectan significativamente las propiedades fisicoquímicas del cacao (Subroto et al., 2023). Para complementar este enfoque, es necesario considerar las prácticas culturales precosecha y los factores intrínsecos de la planta para lograr un control integral de los agentes dañinos que puedan comprometer la salud general del árbol de cacao.

7. CONCLUSIONES

El cultivo del árbol de cacao tiene requerimientos muy específicos en condiciones y calidad del suelo para poder desarrollarse de forma correcta. Estos primeros aspectos engloban una serie de factores como contenido de nutrientes y propiedades físicas. El acondicionamiento del terreno fue crucial para mejorar el funcionamiento agroecosistema del cacao, esto permitió el aprovechamiento integral de los recursos generados por la plantación, así como aumentar el rendimiento del producto designado.

La elaboración de un recubrimiento orgánico con un agente de control biológico proporcionó una alternativa viable para realizar una confrontación entre un organismo patógeno y su contraparte antagonista para minimizar los efectos negativos de una infección completa. La aplicación del recubrimiento tiene como ventaja la compatibilidad de la matriz y su utilización en la agroindustria, estos recubrimientos tienen una versatilidad que les permiten acoplarse a diferentes propósitos y en diversos campos.

El desafío de la utilización del recubrimiento en condiciones de campo radica en los diferentes factores que pueden influir en la efectividad y su durabilidad. Las condiciones ambientales juegan un papel importante al momento de decidir qué método emplear y la periodicidad de dichas aplicaciones. Por lo tanto, es necesario establecer las condiciones ambientales óptimas para garantizar el máximo beneficio al considerar el estado fisiológico adecuado para las coberturas.

El efecto del control biológico del agente antagonista sobre el patógeno causante de los daños en los frutos de cacao muestra la eficacia de los métodos biológicos para el manejo integral de las enfermedades. Los diferentes mecanismos de acción como antibiosis, antagonismo y micoparasitismo brindan diversos caminos para estudiar el efecto que tiene un microorganismo sobre otro, en el caso del *Trichoderma harzianum* sobre el hongo *Moniliophthora roreri* aplican los tres mecanismos, lo cual, establece un campo de efectividad semejante a los controles químicos.

Las características fisicoquímicas de los frutos de cacao son un indicador preciso para saber el manejo y el estado en general del árbol. Estas características se pueden modificar según los intereses para el plantío por parte del productor. Sin embargo, se requiere de un proceso complejo y de diferentes medidas para poder optimizar la producción. En consecuencia, las características fisicoquímicas del fruto de cacao se alteran por influencia de las prácticas culturales precosecha, factores intrínsecos de la planta, condiciones ambientales, temporalidad e incluso aspectos genéticos.

En conclusión, el manejo de moniliasis en frutos de cacao mediante un recubrimiento fungicida es posible debido a los mecanismos de acción entre los organismos involucrados, sin embargo, las características fisicoquímicas de dichos frutos pueden comprometerse debido a diferentes factores, entre ellos, la infección temprana del fruto y, por consiguiente, puede provocar la pérdida de la calidad, la falta de integridad en el fruto y la muerte parcial o total del cultivo.

8. REFERENCIAS

- Aadil, K. R., and H. Jha. 2016. Physico-chemical properties of lignin–alginate based films in the presence of different plasticizers. *Iran. Polym. J.* 25:661–670. doi:10.1007/s13726-016-0449-1.
- Abdulai, I., M. P. Hoffmann, L. Jassogne, R. Asare, S. Graefe, H.-H. Tao, S. Muilerman, P. Vaast, P. Van Asten, P. Läderach, and R. P. Rötter. 2020. Variations in yield gaps of smallholder cocoa systems and the main determining factors along a climate gradient in Ghana. *Agric. Syst.* 181:102812. doi:10.1016/j.agry.2020.102812.
- Acosta-Rojas, and J. A. Villa. 2017. Evaluación de *Trichoderma* spp como Control Biológico en una Plantación a Pequeña Escala de Cacao. *J. Agric. Anim. Scienc.* 5. doi:<https://doi.org/10.22507/jals.v5n2a1>. Available from: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/jals/article/view/1183>
- Agudelo, C., S. Acevedo, L. Carrillo-Hormaza, E. Galeano, and E. Osorio. 2022. Chemometric Classification of Colombian Cacao Crops: Effects of Different Genotypes and Origins in Different Years of Harvest on Levels of Flavonoid and Methylxanthine Metabolites in Raw Cacao Beans. *Molecules.* 27:2068. doi:10.3390/molecules27072068.

Aguilar, C., and F. Guharay. 2013. Caja de herramientas para cacao: Aprendiendo e innovando sobre el manejo sostenible del cultivo de cacao en sistemas agroforestales. Available from: <http://cacaomovil.com/acerca-de/>

Albittar, L., M. Ismail, C. Bragard, and T. Hance. 2016. Host plants and aphid hosts influence the selection behaviour of three aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Eur. J. Entomol.* 113:516–522. doi:10.14411/eje.2016.068.

Alvarado, S., G. Sandoval, I. Palos, S. Tellez, Y. Aguirre-Loredo, and G. Velazquez. 2015. The effect of relative humidity on tensile strength and water vapor permeability in chitosan, fish gelatin and transglutaminase edible films. *Food Sci. Technol.* 35:690–695. doi:10.1590/1678-457X.6797.

Alviz, L., A. Pérez, and A. Pérez-Cordero. 2017. Efecto inhibitorio de compuestos tipo metabolitos de bacterias endófitas contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Burkholderia glumae*. *Rev. Colomb. Cienc. Anim. - RECIA.* 18–25. doi:10.24188/recia.v9.nS.2017.516.

Ancos, B. de, D. González-Peña, C. Colina Coca, and C. Sánchez-Moreno. 2015. Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de IV y V gama. Available from: <https://digital.csic.es/handle/10261/139238>

Andres, C., H. Comoé, A. Beerli, M. Schneider, S. Rist, and J. Jacobi. 2016. Cocoa in Monoculture and Dynamic Agroforestry. In: E. Lichtfouse, editor. *Sustainable Agriculture Reviews: Volume 19*. Springer International Publishing, Cham. p. 121–153. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7_3

Arcaya-Sánchez, E., T. Capote-Luna, and G. González. 2018. PRIMER REPORTE DE *Chilocorus nigrita* (Fabricius, 1798) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) ALIMENTÁNDOSE DE ESCAMAS (HEMIPTERA: DIASPIDIDAE) SOBRE *Washingtonia H.Wendl* (APIACEAE) EN EL ESTADO LARA, VENEZUELA. *Univ. Oriente.* 30:526–531.

Arévalo-Gardini, E., M. Canto, J. Alegre, C. O. Arévalo-Hernández, O. Loli, A. Julca, and V. Baligar. 2020. Cacao agroforestry management systems effects on soil fungi diversity in the Peruvian Amazon. *Ecol. Indic.* 115:106404. doi:10.1016/j.ecolind.2020.106404.

Armengot, L., L. Ferrari, J. Milz, F. Velásquez, P. Hohmann, and M. Schneider. 2020. Cacao agroforestry systems do not increase pest and disease incidence compared with monocultures under good cultural management practices. *Crop Prot.* 130:105047. doi:10.1016/j.cropro.2019.105047.

Armstrong, M., P. Sirous, B. Shan, R. Wang, C. Zhong, J. Liu, and B. Mu. 2018. Prolonged HKUST-1 functionality under extreme hydrothermal conditions by electrospinning polystyrene fibers as a new coating method. *Microporous Mesoporous Mater.* 270:34–39. doi:10.1016/j.micromeso.2018.05.004.

Arvelo, M. A., T. Delgado, S. Maroto, J. Rivera, I. Higuera, and A. Navarro. 2016. Estado actual sobre la producción y el comercio del cacao en América por IICA. IICAC-CIATEJ, Costa Rica. Available from: <https://www.iica.int/sites/default/files/publications/files/2017/BVE17048806e.pdf>

Avendaño-Arrazate, C. H. 2018. BIOLOGÍA FLORAL DE CACAO (*Theobroma cacao* L.); CRIOLLO, TRINITARIO Y FORASTERO EN MÉXICO. *AgroProductividad*. 11. doi:10.32854/agrop.v11i9.1225. Available from: <http://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1225>

Avendaño-Romero, G. C., A. López-Malo, and E. Palou. 2013. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Sel. Ing. Aliment.* 7:87–96.

Bagheri, F., M. Radi, and S. Amiri. 2019. Drying conditions highly influence the characteristics of glycerol-plasticized alginate films. *Food Hydrocoll.* 90:162–171. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.12.001.

Barbut, S., and B. A. Harper. 2019. Dried Ca-alginate films: Effects of glycerol, relative humidity, soy fibers, and carrageenan. *LWT.* 103:260–265. doi:10.1016/j.lwt.2019.01.004.

Barreda, A. T., J. P. Rodríguez, P. U. Bernat, M. Pérez-Hedo, K. Krüger, E. H. Suárez, and A. U. García. 2019. Control biológico clásico en la citricultura mediterránea: el caso de *Trioza erytraeae*. *Phytoma Esp. Rev. Prof. Sanid. Veg.* 23–26.

Barrios-Roblero, C., R. Rosas-Quijano, M. Salvador-Figueroa, D. Gálvez-López, and A. Vázquez-Ovando. 2019. Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Biosci.* 29:47–54. doi:10.1016/j.fbio.2019.03.008.

Basiak, E., A. Lenart, and F. Debeaufort. 2018. How Glycerol and Water Contents Affect the Structural and Functional Properties of Starch-Based Edible Films. *Polymers.* 10:412. doi:10.3390/polym10040412.

Berensztein, N. D., M. Ricci, L. A. Polack, and M. E. Marasas. 2017. Control biológico por conservación: evaluación de los enemigos naturales de *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) en un manejo agroecológico de producción al aire libre de repollo (*Brassica oleracea*) del Cinturón Hortícola de La Plata, Buenos Aires. *Rev. Fac. Agron. Plata.* 116:141-154–154.

Berlanga-Padilla, A. M., A. Gallou, M. A. Ayala-Zermeño, M. G. Serna-Domínguez, R. Montesinos-Matías, J. C. Rodríguez-Rodríguez, H. C. Arredondo-Bernal, A. M. Berlanga-Padilla, A. Gallou, M. A. Ayala-Zermeño, M. G. Serna-Domínguez, R. Montesinos-Matías, J. C. Rodríguez-Rodríguez, and H. C. Arredondo-Bernal. 2018. Hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en

Colima, México. Rev. Mex. Biodivers. 89:986–1001. doi:10.22201/ib.20078706e.2018.4.2334.

Campos-Vega, R., K. H. Nieto-Figueroa, and B. D. Oomah. 2018. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. Trends Food Sci. Technol. 81:172–184. doi:10.1016/j.tifs.2018.09.022.

Candy Industry. 2020. Global Top 100 Candy Companies. Available from: <https://www.candyindustry.com/2020/global-top-100-candy-companies>

Cardenas, E. R., M. F. Ronquillo, J. M. Onofre, and K. Z. Gurumendi. 2016. Producción y comercialización del cacao y su incidencia en el desarrollo socioeconómico del cantón Milagro / Production and marketing of cocoa and its impact in the socio-economic development of Milagro canton. Cienc. Unemi. 9:56–64. doi:10.29076/issn.2528-7737vol9iss17.2016pp56-64p.

Cárdenas Pardo, N. J., A. Darghan, M. D. Sosa Rico, and A. Rodriguez. 2017. Spatial Analysis of Diseases Incidence in Different Cocoa Genotypes (*Theobroma cacao* L.) in Yopal (Casanare), Colombia. Acta Biológica Colomb. 22:209–220. doi:10.15446/abc.v22n2.61161.

Castro-Alayo, E. M., G. Idrogo-Vásquez, R. Siche, and F. P. Cardenas-Toro. 2019. Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. Heliyon. 5:e01157. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01157.

CEDRSSA. 2020. Industria del cacao en México. CEDRSSA. Available from: http://www.cedrssa.gob.mx/post_industria_del_-n-cacao_en_mn-xico-n.htm

Chatterjee, A., and U. Acharya. 2018. Relationship among Different Soil Biochemical Methods to Determine Soil Health. Open J. Soil Sci. 08:303. doi:10.4236/ojss.2018.811022.

Cilas, C., and P. Bastide. 2020. Challenges to Cocoa Production in the Face of Climate Change and the Spread of Pests and Diseases. Agronomy. 10:1232. doi:10.3390/agronomy10091232.

Costa, M. J., A. M. Marques, L. M. Pastrana, J. A. Teixeira, S. M. Sillankorva, and M. A. Cerqueira. 2018. Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. Food Hydrocoll. 81:442–448. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.03.014.

Cubillos Bojacá, A. F., M. C. García Muñoz, A. M. Calvo Salamanca, G. H. Carvajal Rojas, and M. P. Tarazona-Díaz. 2019. Study of the physical and chemical changes during the maturation of three cocoa clones, EET8, CCN51, and ICS60. J. Sci. Food Agric. 99:5910–5917. doi:10.1002/jsfa.9882.

Dehghani, S., S. V. Hosseini, and J. M. Regenstein. 2018. Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chem.* 240:505–513. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.034.

Dewi, M. Y., and A. Husni. 2020. Characterization of Biobased Alginate/Glycerol/Sunflower Oil as Biodegradable Packaging. *E3S Web Conf.* 147:03004. doi:10.1051/e3sconf/202014703004.

Djuideu, C. T. L., H. D. B. Bisseleua, S. Kekeunou, and F. C. Ambele. 2021. Rehabilitation practices in cocoa agroforestry systems mitigate outbreaks of termites and support cocoa tree development and yield. *Agric. Ecosyst. Environ.* 311:107324. doi:10.1016/j.agee.2021.107324.

Dos Santos Silva, J. V., A.-A. F. de Almeida, D. Ahnert, N. M. da Silva, M. L. S. dos Santos, N. de Almeida Santos, and V. C. Baligar. 2020. Foliar applied cuprous oxide fungicide induces physiological, biochemical and molecular changes in cacao leaves. *Sci. Hortic.* 265:109224. doi:10.1016/j.scienta.2020.109224.

Eslamian, M., and F. Soltani-Kordshuli. 2018. Development of multiple-droplet drop-casting method for the fabrication of coatings and thin solid films. *J. Coat. Technol. Res.* 15:271–280. doi:10.1007/s11998-017-9975-9.

Espinoza-Ahumada, C. A., G. Gallegos-Morales, F. D. Hernández-Castillo, Y. M. Ochoa-Fuentes, M. Cepeda-Siller, and F. Castillo-Reyes. 2019. Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Ecosistemas Recur. Agropecu.* 6:45–55. doi:DOI: 10.19136/era.a6n16.1843.

Evans, H. C. 2016. Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). In: B. A. Bailey and L. W. Meinhardt, editors. *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*. Springer International Publishing, Cham. p. 63–96. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_3

Expósito, I., and J. A. Pino. 2018. Secado de aromas de alimentos por aspersion. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 20. Available from: <http://revcitecal.iiiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/article/view/401>

FAO. 2019. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. Available from: <http://www.fao.org/3/ca6030es/ca6030es.pdf>

Feregrino-Pérez, A. A., L. C. Berumen, G. García-Alcocer, R. G. Guevara-Gonzalez, M. Ramos-Gomez, R. Reynoso-Camacho, J. A. Acosta-Gallegos, and G. Loarca-Piña. 2008. Composition and Chemopreventive Effect of Polysaccharides from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-Induced Colon Cancer. *J. Agric. Food Chem.* 56:8737–8744. doi:10.1021/jf8007162.

Fernández, N. M., D. C. Echeverría, S. A. M. Sanchez, and S. P. P. Peña. 2017. Estado actual del uso de recubrimientos comestibles en frutas y hortalizas. *INGRESAR Rev.* 15:134–141. doi:10.18684/BSAA(15)134-141.

Fernández Valdés, Daybelis, S. Bautista Baños, Dayvis Fernández Valdés, A. Ocampo Ramírez, A. García Pereira, and A. Falcón Rodríguez. 2015. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Rev. Cienc. Téc. Agropecu.* 24:52–57.

Fernández-Jiménez, M. A., D. M. Bulla-Castañeda, A. M. Sanabria-Villate, and M. O. Pulido-Medellín. 2019. Implementación de hongos nematófagos para el control de parásitos gastrointestinales. *Pensam. Acción.* 7–20.

Figuroa-Hernández, C., J. Mota-Gutierrez, I. Ferrocino, Z. J. Hernández-Estrada, O. González-Ríos, L. Cocolin, and M. L. Suárez-Quiroz. 2019. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *Int. J. Food Microbiol.* 301:41–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002.

Fourie, A., M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, M. A. van der Nest, M. T. Loots, and I. Barnes. 2018. Inheritance of phenotypic traits in the progeny of a *Ceratocystis* interspecific cross. *Fungal Biol.* 122:717–729. doi:10.1016/j.funbio.2018.03.001.

Gateau-Rey, L., E. V. J. Tanner, B. Rapidel, J.-P. Marelli, and S. Royaert. 2018. Climate change could threaten cocoa production: Effects of 2015-16 El Niño-related drought on cocoa agroforests in Bahia, Brazil. *PLOS ONE.* 13:e0200454. doi:10.1371/journal.pone.0200454.

Giuseppe, M. D., N. Law, B. Webb, R. A. Macrae, L. J. Liew, T. B. Sercombe, R. J. Dilley, and B. J. Doyle. 2018. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 79:150–157. doi:10.1016/j.jmbbm.2017.12.018.

Giz, A. S., M. Berberoglu, S. Bener, S. Aydelik-Ayazoglu, H. Bayraktar, B. E. Alaca, and H. Catalgil-Giz. 2020. A detailed investigation of the effect of calcium crosslinking and glycerol plasticizing on the physical properties of alginate films. *Int. J. Biol. Macromol.* 148:49–55. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.01.103.

González, R. M., J. Mendoza R., D. Pérez V., and A. Soler. 2019. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias endógenas contra *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*: Antimicrobial activity of endogenous bacteria against *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. *Acta Hort.* 195–202. doi:10.17660/ActaHortic.2019.1239.24.

Gu, C., Q. Zhou, R. D. Cusick, and A. J. Margenot. 2021. Evaluating agronomic soil phosphorus tests for soils amended with struvite. *Geoderma.* 399:115093. doi:10.1016/j.geoderma.2021.115093.

Guato-Molina, J. J., J. A. Auhing-Arcos, J. A. Crespo-Ávila, G. A. Esmeraldas-García, A. F. Mendoza-León, and H. F. Canchignia-Martínez. 2019. Bacterias promotoras del crecimiento en plantas con potencial agente biocontrolador a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, y *Moniliophthora roreri*. *Sci. Agropecu.* 10:393–402. doi:10.17268/sci.agropecu.2019.03.10.

Gutiérrez García, G. A., I. Gutiérrez-Montes, H. E. Hernández Núñez, J. C. Suárez Salazar, and F. Casanoves. 2020. Relevance of local knowledge in decision-making and rural innovation: A methodological proposal for leveraging participation of Colombian cocoa producers. *J. Rural Stud.* 75:119–124. doi:10.1016/j.jrurstud.2020.01.012.

Gutiérrez, O. A., A. S. Campbell, and W. Phillips-Mora. 2016. Breeding for Disease Resistance in Cacao. In: B. A. Bailey and L. W. Meinhardt, editors. *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*. Springer International Publishing, Cham. p. 567–609. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_18

Guzmán-Plazola, P., R. D. Guevara-Gutiérrez, J. L. Olguín-López, and O. R. Mancilla-Villa. 2016. Perspectiva campesina, intoxicaciones por plaguicidas y uso de agroquímicos. *Idesia Arica.* 34:69–80. doi:10.4067/S0718-34292016000300009.

Hartemink, A. E. 2005. Nutrient Stocks, Nutrient Cycling, and Soil Changes in Cocoa Ecosystems: A Review. In: *Advances in Agronomy*. Vol. 86. Academic Press. p. 227–253. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211305860055>

Hassan, B., S. A. S. Chatha, A. I. Hussain, K. M. Zia, and N. Akhtar. 2018. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 109:1095–1107. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097.

Hernández Montiel, L. G., R. G. Chiquito Contreras, D. G. Castillo Rocha, C. J. Chiquito Contreras, L. Vidal Hernández, F. A. Beltrán Morales, L. G. Hernández Montiel, R. G. Chiquito Contreras, D. G. Castillo Rocha, C. J. Chiquito Contreras, L. Vidal Hernández, and F. A. Beltrán Morales. 2018. Efecto de microcápsulas de *Pseudomonas putida* sobre crecimiento y rendimiento de pimiento morrón. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 9:4223–4233. doi:10.29312/remexca.v0i20.992.

Hernández-Torres, C. de J., A. Iliina, J. M. Ventura-Sobrevilla, R. E. Belmares-Cerda, J. C. Contreras-Esquivel, G. Michelena Álvarez, and J. L. Martínez- Hernández. 2016. La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria. *ICIDCA Sobre Los Deriv. Caña Azúcar.* 50. Available from: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=223148420003>

Herrera, W., O. Valbuena, and D. Pavone-Maniscalco. 2020. Formulation of *Trichoderma asperellum* TV190 for biological control of *Rhizoctonia solani* on corn seedlings. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 30:44. doi:10.1186/s41938-020-00246-9.

Hidayati, S., Zulferiyenni, U. Maulidia, W. Satyajaya, and S. Hadi. 2021. Effect of glycerol concentration and carboxy methyl cellulose on biodegradable film characteristics of seaweed waste. *Heliyon*. 7. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07799. Available from: [https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440\(21\)01902-2](https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440(21)01902-2)

Hipólito-Romero, E., M. G. Carcaño-Montiel, J. M. Ramos-Prado, E. A. Vázquez-Cabañas, L. López-Reyes, and J. Ricaño-Rodríguez. 2017. Efecto de inoculantes bacterianos edáficos mixtos en el desarrollo temprano de cultivares mejorados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en un sistema agroforestal tradicional del norte de Oaxaca, México. *Rev. Argent. Microbiol.* 49:356–365. doi:10.1016/j.ram.2017.04.003.

Hoffmann, M. P., J. Cock, M. Samson, N. Janetski, K. Janetski, R. P. Rötter, M. Fisher, and T. Oberthür. 2020. Fertilizer management in smallholder cocoa farms of Indonesia under variable climate and market prices. *Agric. Syst.* 178:102759. doi:10.1016/j.agsy.2019.102759.

Hosseini Bai, S., S. J. Trueman, T. Nevenimo, G. Hannet, P. Bapiwai, M. Poienou, and H. M. Wallace. 2017. Effects of shade-tree species and spacing on soil and leaf nutrient concentrations in cocoa plantations at 8 years after establishment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 246:134–143. doi:10.1016/j.agee.2017.06.003.

ICCO. 2015. Pests & Diseases. Int. Cocoa Organ. Available from: <https://www.icco.org/pests-diseases/>

Jaramillo-Cuetochoambo, A., and L. F. López-Martínez. 2019. Plan de Mercadeo Internacional para Chocolate Premium Colombiano [Grado]. Universidad Autónoma de Occidente, Colombia.

Ji, R., J. Wu, J. Zhang, T. Wang, X. Zhang, L. Shao, D. Chen, and J. Wang. 2019. Extending Viability of *Bifidobacterium longum* in Chitosan-Coated Alginate Microcapsules Using Emulsification and Internal Gelation Encapsulation Technology. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01389. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6609881/>

Jiménez, I. J. C., I. G. T. Guncay, Ms. J. N. Q. Guerrero, and D. C. R. M. G. Batista. 2018. Presecado: Su efecto sobre la calidad sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Rev. Científica Agroecosistemas.* 6:63–73.

Ju, J., Y. Xie, Y. Guo, Y. Cheng, H. Qian, and W. Yao. 2019. Application of edible coating with essential oil in food preservation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59:2467–2480. doi:10.1080/10408398.2018.1456402.

Kale, R. D., Y. Maurya, and T. Potdar. 2018. Paper-reinforced sodium alginate/carboxyl methyl cellulose-based bio-composite films. *J. Plast. Film Sheeting.* 34:179–195. doi:10.1177/8756087917715675.

Kawakita, R., S. Strobel, B. Soares, H. B. Scher, T. Becker, D. Dale, and T. Jeoh. 2021. Fluidized bed spray-coating of enzyme in a cross-linked alginate matrix shell (CLAMshell). *Powder Technol.* 386:372–381. doi:10.1016/j.powtec.2021.03.045.

Khairunnisa, S., J. Junianto, Z. Zahidah, and I. Rostini. 2018. The effect of glycerol concentration as a plasticizer on edible films made from alginate towards its physical characteristic. *World Sci. News.* 112:130–141.

Khan, M. R., and F. A. Mohiddin. 2018. Chapter 13 - Trichoderma: Its Multifarious Utility in Crop Improvement. In: R. Prasad, S. S. Gill, and N. Tuteja, editors. *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology.* Elsevier. p. 263–291. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044463987500013X>

Khatun, M. A., M. M. Hossain, M. A. Bari, K. M. Abdullahil, M. S. Parvez, M. F. Alam, and A. H. Kabir. 2018. Zinc deficiency tolerance in maize is associated with the up-regulation of Zn transporter genes and antioxidant activities. *Plant Biol.* 20:765–770. doi:10.1111/plb.12837.

Kongor, J. E., M. Hinneh, D. V. de Walle, E. O. Afoakwa, P. Boeckx, and K. Dewettinck. 2016. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — A review. *Food Res. Int.* 82:44–52. doi:10.1016/j.foodres.2016.01.012.

Leiva, S., M. Oliva, E. Hernández, B. Chuquibala, K. Rubio, F. García, and M. Torres de la Cruz. 2020. Assessment of the Potential of *Trichoderma* spp. Strains Native to Bagua (Amazonas, Peru) in the Biocontrol of Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). *Agronomy.* 10:1376. doi:10.3390/agronomy10091376.

Leiva, S., K. Rubio, J. R. Díaz-Valderrama, M. Granda-Santos, and L. Mattos. 2022. Phylogenetic Affinity in the Potential Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Moniliophthora roreri*. *Agronomy.* 12:2052. doi:10.3390/agronomy12092052.

Lim, H. K., C. P. Tan, R. Karim, A. A. Ariffin, and J. Bakar. 2010. Chemical composition and DSC thermal properties of two species of *Hylocereus* cacti seed oil: *Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*. *Food Chem.* 119:1326–1331. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.002.

Linares-Castañeda, A., M. O. Franco-Hernández, Y. de las M. Gómez y Gómez, and L. J. Corzo-Rios. 2023. Physical properties of zein-alginate-glycerol edible films and their application in the preservation of chili peppers (*Capsicum annuum* L.). *Food Sci. Biotechnol.* doi:10.1007/s10068-023-01393-z. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01393-z>

Liu, C., T. Jin, W. Liu, W. Hao, L. Yan, and L. Zheng. 2021. Effects of hydroxyethyl cellulose and sodium alginate edible coating containing asparagus waste extract on postharvest quality of strawberry fruit. *LWT.* 148:111770. doi:10.1016/j.lwt.2021.111770.

López, S. M., M. E. Franco, G. Pastorino, M. Saparrat, B. L. Ronco, and P. A. Balatti. 2017. Bacterias endófitas de tomate y su acción antagonista contra hongos fitopatógenos. In: Comisión de Investigación Científicas. Argentina. Available from: <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/8208>

López-Cruz, A., L. Soto-Pinto, M. G. Salgado-Mora, and G. Huerta-Palacios. 2021. Simplification of the structure and diversity of cocoa agroforests does not increase yield nor influence frosty pod rot in El Soconusco, Chiapas, Mexico. *Agrofor. Syst.* 95:201–214. doi:10.1007/s10457-020-00574-7.

López-López, M. E., C. L. Del-Toro-Sánchez, M. Gutiérrez-Lomelí, S. Ochoa-Ascencio, J. A. Aguilar-López, M. A. Robles-García, M. Plascencia-Jatomea, A. T. Bernal-Mercado, O. Martínez-Cruz, M. G. Ávila-Novoa, J. P. González-Gómez, and P. J. Guerrero-Medina. 2022. Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity against Avocado (*Persea americana* Mill) Fruit Pathogens. *Horticulturae*. 8:714. doi:10.3390/horticulturae8080714.

Mahaly, M., A. K. Senthilkumar, S. Arumugam, C. Kaliyaperumal, and N. Karupannan. 2018. Vermicomposting of distillery sludge waste with tea leaf residues. *Sustain. Environ. Res.* 28:223–227. doi:10.1016/j.serj.2018.02.002.

Makhatha, M. E., O. S. Fatoba, and E. T. Akinlabi. 2018. Effects of rapid solidification on the microstructure and surface analyses of laser-deposited Al-Sn coatings on AISI 1015 steel. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 94:773–787. doi:10.1007/s00170-017-0876-y.

Marelli, J.-P., D. I. Guest, B. A. Bailey, H. C. Evans, J. K. Brown, M. Junaid, R. W. Barreto, D. O. Lisboa, and A. S. Puig. 2019. Chocolate Under Threat from Old and New Cacao Diseases. *Phytopathology*®. 109:1331–1343. doi:10.1094/PHYTO-12-18-0477-RVW.

Martínez, B., D. Infante, and Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.* 28:1–11.

Martínez-Padrón, H. Y., E. O. Osorio-Hernández, B. Estrada-Drouaillet, J. A. López-Santillán, S. E. Varela-Fuentes, and J. A. Torres-Castillo. 2017. Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma* spp. *Agroproductividad*. 10:9–14.

Martins Alves, A. M., S. Pereira Menezes, E. Matos Lima, K. Peres Gramacho, B. Silva Andrade, M. Macêdo Ferreira, C. P. Pirovani, and F. Micheli. 2019. The selenium-binding protein of *Theobroma cacao*: A thermostable protein involved in the witches' broom disease resistance. *Plant Physiol. Biochem.* 142:472–481. doi:10.1016/j.plaphy.2019.08.005.

Mbarga, J. B., B. A. D. Begoude, Z. Ambang, M. Meboma, J. Kuate, W. Ewbank, and G. M. ten Hoopen. 2020. Field testing an oil-based *Trichoderma asperellum* formulation for the biological control of cacao black pod disease, caused by

Phytophthora megakarya. Crop Prot. 132:105134.
doi:10.1016/j.cropro.2020.105134.

McMahon, P., and A. Purwantara. 2016. Vascular Streak Dieback (*Ceratobasidium theobromae*): History and Biology. In: B. A. Bailey and L. W. Meinhardt, editors. *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*. Springer International Publishing, Cham. p. 307–335. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_9

de Medeiros, F. H. V., and J. C. P. da Silva. 2019. Plant Diseases. In: B. Souza, L. L. Vázquez, and R. C. Marucci, editors. *Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems: Biological Control and Functional Biodiversity*. Springer International Publishing, Cham. p. 451–466. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-24733-1_36

Medina-Jaramillo, C., C. Quintero-Pimiento, D. Díaz-Díaz, S. Goyanes, and A. López-Córdoba. 2020. Improvement of Andean Blueberries Postharvest Preservation Using Carvacrol/Alginate-Edible Coatings. *Polymers*. 12:2352. doi:10.3390/polym12102352.

Miras, A. R., I. Cano, J. Mourrut, F. Wäckers, and A. Pekas. 2017. La aplicación de polen de *Typha angustifolia* adelanta la instalación, el desarrollo poblacional y la dispersión de *Amblyseius swirskii* en cultivo de pimiento. *Phytoma Esp. Rev. Prof. Sanid. Veg.* 76–82.

Mishra, S. P., A. Pandey, and M. K. Srivastava. 2018. Studies on Different Forms of Sulphur in Alluvial Soil. *SAMRIDDHI J. Phys. Sci. Eng. Technol.* 10:107–114. doi:10.18090/samriddhi.v10i02.5.

Molea, A., P. Visuian, I. Barabás, R. C. Suciú, and N. V. Burnete. 2017. Key fuel properties and engine performances of diesel-ethanol blends, using tetrahydrofuran as surfactant additive. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 252:012077. doi:10.1088/1757-899X/252/1/012077.

Nechita, P., and M. Roman (Iana-Roman). 2020. Review on Polysaccharides Used in Coatings for Food Packaging Papers. *Coatings*. 10:566. doi:10.3390/coatings10060566.

Niether, W., L. Armengot, C. Andres, M. Schneider, and G. Gerold. 2018. Shade trees and tree pruning alter throughfall and microclimate in cocoa (*Theobroma cacao* L.) production systems. *Ann. For. Sci.* 75:38. doi:10.1007/s13595-018-0723-9.

Obia, A., J. Mulder, S. E. Hale, N. L. Nurida, and G. Cornelissen. 2018. The potential of biochar in improving drainage, aeration and maize yields in heavy clay soils. *PLOS ONE*. 13:e0196794. doi:10.1371/journal.pone.0196794.

Ofori, A., F. K. Padi, and I. Amoako-Attah. 2020. Field evaluation of cacao progenies derived from Guiana clones for yield and black pod disease resistance. *Crop Sci.* 60:249–261. doi:10.1002/csc2.20101.

Olivas, G. I., and G. V. Barbosa-Cánovas. 2008. Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT - Food Sci. Technol.* 41:359–366. doi:10.1016/j.lwt.2007.02.015.

Oomah, B. D., A. Cardador-Martínez, and G. Loarca-Piña. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *J. Sci. Food Agric.* 85:935–942. doi:10.1002/jsfa.2019.

Osorio G., M. A., E. I. Leiva R., and R. Ramírez P. 2017. Cacao (*Theobroma cacao* L.) seedlings growth in different pot sizes. *Rev. Cienc. Agríc.* 34:73–82. doi:10.22267/rcia.173402.73.

Osorio-Hernández, E., R. Rodríguez-Herrera, and F. D. Hernández-Castillo. 2009. *Trichoderma* spp, una alternativa para el control de hongos fitopatógenos. *Cienc. Cierta.* 17.

Ota, A., K. Istenič, M. Skrt, N. Šegatin, N. Žnidaršič, K. Kogej, and N. P. Ulrih. 2018. Encapsulation of pantothenic acid into liposomes and into alginate or alginate–pectin microparticles loaded with liposomes. *J. Food Eng.* 229:21–31. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.06.036.

Ovruski, S. M., C. Colin, A. Soria, L. E. Oroño, and P. Schliserman. 2017. Introduction and laboratory production of *Diachasmimorpha tryoni* and *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) for the biological control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Argentina. *Rev. Soc. Entomológica Argent.* 62. Available from: <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/view/28357>

Papalexandratou, Z., K. Kaasik, L. V. Kauffmann, A. Skorstengaard, G. Bouillon, J. L. Espensen, L. H. Hansen, R. R. Jakobsen, A. Blennow, L. Krych, J. L. Castro-Mejía, and D. S. Nielsen. 2019. Linking cocoa varieties and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. *Int. J. Food Microbiol.* 304:106–118. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.012.

Pereira, A. da S., M. M. Diniz, G. De Jong, H. S. Gama Filho, M. J. dos Anjos, P. V. Finotelli, G. C. Fontes-Sant'Ana, and P. F. F. Amaral. 2019. Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics. *Int. J. Biol. Macromol.* 139:621–630. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.08.009.

Pereyra, P. M., M. Ordano, C. Reguilón, A. R. Salvatore, C. Acosta, and L. Risso. 2016. The role of density and sex ratio of adults in fertility of *Diatraea saccharalis*

(Lepidoptera: Crambidae) in mass rearing cages. *Rev. Soc. Entomológica Argent.* 75. Available from: <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/view/27782>

Pérez, A., R. Hermosa, and E. Monte. 2017. Actividades de biocontrol de «trichoderma» frente a ascomicetos fitopatógenos. *FarmaJournal.* 2:85-93–93.

Pérez, M. A., and J. D. Contreras. 2017. Instructivo de buenas prácticas de cosecha y pos-cosecha. 1st ed. Fundación Suiza para la cooperación técnica, Colombia. Available from: https://www.swisscontact.org/fileadmin/user_upload/COUNTRIES/Colombia/Documents/Guia_de_buenas_practicas_de_poscosecha.pdf

Phillips-Mora, W., and R. Cerda Bustillos. 2009. Catalog: cacao diseases in Central America. 1st ed. Turrialba, Costa Rica. Available from: http://www.worldcocoaafoundation.org/wp-content/uploads/files_mf/phillipsmoradiseasespestscentr.amer.english3.29mb.pdf

PROFECO. 2018. El chocolate. Alimento de los dioses. gob.mx. Available from: <http://www.gob.mx/profeco/documentos/el-chocolate-alimento-de-los-dioses?state=published>

Prus-Walendziak, W., and J. Kozłowska. 2021. Design of Sodium Alginate/Gelatin-Based Emulsion Film Fused with Polylactide Microparticles Charged with Plant Extract. *Materials.* 14:745. doi:10.3390/ma14040745.

Puerto, P. P., S. Guerra, and D. Contreras. 2016. Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes. *Sci. Agropecu.* 7:111–119.

Rahmani, B., H. Hosseini, M. Khani, M. Farhoodi, Z. Honarvar, E. Feizollahi, B. Shokri, and S. Shojaee-Aliabadi. 2017. Development and characterisation of chitosan or alginate-coated low density polyethylene films containing *Satureja hortensis* extract. *Int. J. Biol. Macromol.* 105:121–130. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.002.

Ramakrishnan, R., S. V. Kulandhaivelu, and S. Roy. 2023. Alginate/carboxymethyl cellulose/starch-based active coating with grapefruit seed extract to extend the shelf life of green chilli. *Ind. Crops Prod.* 199:116752. doi:10.1016/j.indcrop.2023.116752.

Ramírez Gil, J. G. 2016. Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp., y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al., en la hacienda *Theobroma*, Colombia. *Rev. Protección Veg.* 31:42–49.

Ramos, P. E., P. Silva, M. M. Alario, L. M. Pastrana, J. A. Teixeira, M. A. Cerqueira, and A. A. Vicente. 2018. Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. *Food Hydrocoll.* 77:8–16. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.08.031.

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

Reyes-Avalos, M. C., A. Femenia, R. Minjares-Fuentes, J. C. Contreras-Esquivel, C. N. Aguilar-González, J. R. Esparza-Rivera, and J. A. Meza-Velázquez. 2016. Improvement of the Quality and the Shelf Life of Figs (*Ficus carica*) Using an Alginate–Chitosan Edible Film. *Food Bioprocess Technol.* 9:2114–2124. doi:10.1007/s11947-016-1796-9.

Reyes-Figueroa, O., C. F. Ortiz-García, M. Torres-de la Cruz, L. del C. Lagunes-Espinoza, G. Valdovinos-Ponce, O. Reyes-Figueroa, C. F. Ortiz-García, M. Torres-de la Cruz, L. del C. Lagunes-Espinoza, and G. Valdovinos-Ponce. 2016. Especies de *Trichoderma* del agroecosistema cacao con potencial de biocontrol sobre *Moniliophthora roreri*. *Rev. Chapingo Ser. Cienc. For. Ambiente.* 22:149–163. doi:10.5154/r.rchscfa.2015.08.036.

Robledo, L. 2018. *Larousse del chocolate*. 1st ed. Larousse, México.

Rodríguez, W. J. M., C. A. V. Torres, P. D. S. Bósquez, Y. G. T. Navarrete, J. F. V. Chang, and E. D. A. Cedeño. 2016. Mejoramiento de las características físico-químicas y sensoriales del cacao CCN51 a través de la adición de una enzima y levadura durante el proceso de fermentación. *Rev. Amaz. Cienc. Tecnol.* 5:169–181.

Rodríguez-Palomera, M., J. Cambero.Campos, G. Luna-Esquivel, O. Estrada-Virgen, N. De Dios-Ávila, and C. Cambero-Ayón. 2016. COCCINÉLIDOS DEPREDADORES DEL PULGÓN AMARILLO DEL SORGO *Melanaphis sacchari* (ZEHTNER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EN NAYARIT, MÉXICO. *Entomol. Agríc.* 3:360–364.

Rojas, K. E., M. C. García, I. X. Cerón, R. E. Ortiz, and M. P. Tarazona. 2020. Identification of potential maturity indicators for harvesting cacao. *Heliyon.* 6:e03416. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03416.

SAGARPA. 2017. *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256425/B_sico-Cacao.pdf

Salama, H. E., M. S. Abdel Aziz, and M. Alsehli. 2019. Carboxymethyl cellulose/sodium alginate/chitosan biguanidine hydrochloride ternary system for edible coatings. *Int. J. Biol. Macromol.* 139:614–620. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.08.008.

Salazar, E., R. Valenzuela, M. Aguilar, N. Aranda, A. Sotelo, G. C. Chire-Fajardo, and M. Ureña. 2020. Physicochemical properties and microbial group behavior of postharvest peruvian cocoa bean (*Theobroma cacao* L.). *Enfoque UTE.* 11:48–56. doi:10.29019/enfoqueute.v11n4.602.

Samaniego, I., S. Espín, J. Quiroz, B. Ortiz, W. Carrillo, C. García-Viguera, and P. Mena. 2020. Effect of the growing area on the methylxanthines and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador. *J. Food Compos. Anal.* 88:103448. doi:10.1016/j.jfca.2020.103448.

Saravia-Matus, S. L., A. G. Rodríguez, and J. A. Saravia. 2020. Determinants of certified organic cocoa production: evidence from the province of Guayas, Ecuador. *Org. Agric.* 10:23–34. doi:10.1007/s13165-019-00248-4.

Sauvadet, M., S. Saj, G. T. Freschet, J.-D. Essobo, S. Enock, T. Becquer, P. Tixier, and J.-M. Harmand. 2020. Cocoa agroforest multifunctionality and soil fertility explained by shade tree litter traits. *J. Appl. Ecol.* 57:476–487. doi:10.1111/1365-2664.13560.

Schaad, N., and I. Fromm. 2018. Sustainable Cocoa Production Program (SCPP): Analysis of cocoa beans processing and quality in post-harvest in South East Sulawesi in Indonesia. *Asia Pac. J. Sustain. Agric. Food Energy.* 6:1–6. doi:https://doi.org/10.24451/arbor.6827.

Schroth, G., P. Läderach, A. I. Martínez-Valle, C. Bunn, and L. Jassogne. 2016. Vulnerability to climate change of cocoa in West Africa: Patterns, opportunities and limits to adaptation. *Sci. Total Environ.* 556:231–241. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.03.024.

SIAP. 2016. Producción Agrícola. Acciones Programas. Available from: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>

SIAP. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017 - 2030. Secr. Agric. Desarro. Rural. Available from: <http://www.gob.mx/agricultura/acciones-y-programas/planeacion-agricola-nacional-2017-2030-126813>

SIAP. 2018. Resumen Nacional Intención de cosecha 2018. Intención Cosecha Perenne. Available from: http://infosiap.siap.gob.mx/opt/agricultura/intencion/Intencion_cosechaPerenne_cultivo2018.pdf

Sifuentes-Nieves, I., E. Hernández-Hernández, G. Neira-Velázquez, E. Morales-Sánchez, G. Mendez-Montevalvo, and G. Velazquez. 2019. Hexamethyldisiloxane cold plasma treatment and amylose content determine the structural, barrier and mechanical properties of starch-based films. *Int. J. Biol. Macromol.* 124:651–658. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.211.

Silva, R. N., V. N. Monteiro, A. S. Steindorff, E. V. Gomes, E. F. Noronha, and C. J. Ulhoa. 2019. Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biol.* 123:565–583. doi:10.1016/j.funbio.2019.06.010.

Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu

reagent. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 299. Academic Press. p. 152–178. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999990171>

Sitohang, N., and R. Siahaan. 2018. Fruit Characteristics of Cocoa in Various Altitude Place. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 205:012022. doi:10.1088/1755-1315/205/1/012022.

Solano-Doblado, L. G., L. Alamilla-Beltrán, and C. Jiménez-Martínez. 2018. Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas.* 21:30–42. doi:10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153.

Solano-Doblado, L. G., L. Alamilla-Beltrán, and C. Jiménez-Martínez. 2019. Functionalized edible films and coatings. *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas.* 21:30–42.

Solís, N., C. Chiriboga, R. Avalos, D. Rueda, C. Albán, M. Bangeppagari, B. Rueda Benítez, and M. Selvanayagam. 2016. Use of Cellulase enzyme obtained from *Monilia (Moniliophthora roreri)* for treatment of solid waste of Cob, Rice husks and Cocoa shell. *J. Appl. Pharm. Sci.* 6:66–70. doi:10.7324/JAPS.2016.60311.

Sosa-del Castillo, D., J. Álvarez-Barreto, and S. Pérez-Martínez. 2015. Encapsulación de *Trichoderma* en micropartículas de alginato para el control de patógenos de cacao. *Rev. Protección Veg.* 30:80–80.

de Souza, P. A., L. F. Moreira, D. H. A. Sarmiento, and F. B. da Costa. 2018. Cacao—*Theobroma cacao*. In: S. Rodrigues, E. de Oliveira Silva, and E. S. de Brito, editors. *Exotic Fruits*. Academic Press. p. 69–76. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128031384000101>

Stocco, M., G. Lampugnani, S. Zuluaga, C. Abramoff, C. Cordo, and C. Mónaco. 2019. Fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum*: su supervivencia en el suelo. *Rev. Fac. Agron.* 118:020–020. doi:10.24215/16699513e020.

Suárez Salazar, J. C., L. M. Melgarejo, E. H. Durán Bautista, J. A. Di Rienzo, and F. Casanoves. 2018. Non-destructive estimation of the leaf weight and leaf area in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Sci. Hortic.* 229:19–24. doi:10.1016/j.scienta.2017.10.034.

Suárez-Contreras, L. Y. 2005. Extracción y purificación del adn de *moniliophthora roreri* hongo que ataca el cacao, en norte de santander. *Respuestas.* 10:4–8. doi:10.22463/0122820X.629.

Suárez-Contreras, L. Y. 2016. Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/58437>

Subroto, E., M. Djali, R. Indiartho, E. Lembong, and N. Baiti. 2023. Microbiological Activity Affects Post-Harvest Quality of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Beans. *Horticulturae*. 9:805. doi:10.3390/horticulturae9070805.

Suhag, R., N. Kumar, A. Trajkovska Petkoska, and A. Upadhyay. 2020. Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. *Food Res. Int.* 136:109582. doi:10.1016/j.foodres.2020.109582.

Taherian, M., A. Bostani, and H. Omid. 2019. Boron and pigment content in alfalfa affected by nano fertilization under calcareous conditions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 53:136–143. doi:10.1016/j.jtemb.2019.02.014.

Tirado-Gallego, P. A., A. Lopera-Álvarez, and L. A. Ríos-Osorio. 2016. Strategies for Control of *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa* in *Theobroma cacao* L.: A Systematic Review. *Cienc. Tecnol. Agropecu.* 17:417–430. doi:10.21930/rcta.vol17_num3_art:517.

Torres-De la Cruz, M., C. F. Ortiz-García, C. Bautista-Muñoz, J. A. Ramírez-Pool, N. Ávalos-Contreras, S. Cappello-García, and A. De la Cruz-Pérez. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 86:947–961. doi:10.1016/j.rmb.2015.07.012.

Torres-Guizado, P. R. 2016. Manual de proceso de calidad de cacao fino de aroma. 1st ed. CAC.PANGO, Lima, Perú. Available from: <https://issuu.com/vecoandino/docs/m1>

Vanhove, W., R. K. Yao, J.-C. N'Zi, L. A. N'Guessan Toussaint, A. Kaminski, G. Smaghe, and P. Van Damme. 2020. Impact of insecticide and pollinator-enhancing substrate applications on cocoa (*Theobroma cacao*) cheryle and pod production in Côte d'Ivoire. *Agric. Ecosyst. Environ.* 293:106855. doi:10.1016/j.agee.2020.106855.

Vásquez, Z. S., D. P. de Carvalho Neto, G. V. M. Pereira, L. P. S. Vandenberghe, P. Z. de Oliveira, P. B. Tiburcio, H. L. G. Rogez, A. Góes Neto, and C. R. Soccol. 2019. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Manag.* 90:72–83. doi:10.1016/j.wasman.2019.04.030.

Vázquez, L. L. 2017. EL CONTROL BIOLÓGICO INTEGRADO AL MANEJO TERRITORIAL DE PLAGAS DE INSECTOS EN CUBA. *Agroecología*. 12:39–46.

Vélez, J. R. P., Á. G. C. López, D. Y. R. Loor, P. C. F. Navarrete, J. A. A. Candell, M. Z. Zambrano, and C. Wehenkel. 2017. Crecimiento y antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp., en el control de *Moniliophthora roreri*, mediante modelos matemáticos. *Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biológicas*. 38:87–96. doi:10.26807/remcb.v38i2.548.

Villamil Carvajal, J. E., S. Viteri, and W. L. Villegas Orozco. 2014. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif &

Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. *Rev. Fac. Nac. Agron.* 68:7441–7450. doi:10.15446/rfnam.v68n1.47830.

Villanueva, D. M. L. 2018. Eficacia de biofungicidas frente a la caída de plántula de pepino, inducida por *Pythium aphanidermatum*. *Rev. Investig. En Agroproducción Sustentable.* 2:72–78.

Vinale, F., R. Marra, F. Scala, E. I. Ghisalberti, M. Lorito, and K. Sivasithamparam. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 43:143–148. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01939.x.

Wang, Z., S. Hu, and H. Wang. 2017. Scale-Up Preparation and Characterization of Collagen/Sodium Alginate Blend Films. *J. Food Qual.* 2017:e4954259. doi:<https://doi.org/10.1155/2017/4954259>. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2017/4954259/>

Yao, J., Y. Zhou, X. Chen, F. Ma, P. Li, and C. Chen. 2018. Effect of sodium alginate with three molecular weight forms on the water holding capacity of chicken breast myosin gel. *Food Chem.* 239:1134–1142. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.027.

Yépez, P. I. T., S. L. P. Villafuerte, Z. K. S. Hidalgo, D. I. V. Coello, J. B. N. Cedeño, and M. A. H. Defaz. 2019. Compatibilidad in vitro de *Trichoderma* spp. con fungicidas de uso común en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Investig. Agrar.* 20:146–151.

Yin, C., C. Huang, J. Wang, Y. Liu, P. Lu, and L. Huang. 2019. Effect of Chitosan- and Alginate-Based Coatings Enriched with Cinnamon Essential Oil Microcapsules to Improve the Postharvest Quality of Mangoes. *Materials.* 12:2039. doi:10.3390/ma12132039.

Zapata Bustamante, S., A. Tamayo Tenorio, and B. A. Rojano. 2015. Efecto del Tostado Sobre los Metabolitos Secundarios y la Actividad Antioxidante de Clones de Cacao Colombiano. *Rev. Fac. Nac. Agron. - Medellín.* 68. Available from: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=179933010011>

Zenil Lugo, N., M. T. Colinas León, C. Bautista Bañuelos, T. R. Vázquez Rojas, H. Lozoya Saldaña, and M. T. Martínez Damián. 2014. Total phenols and antioxidant capacity estimated with DPPH/ABTS assays in roses on preservative solutions. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 5:1029–1039.