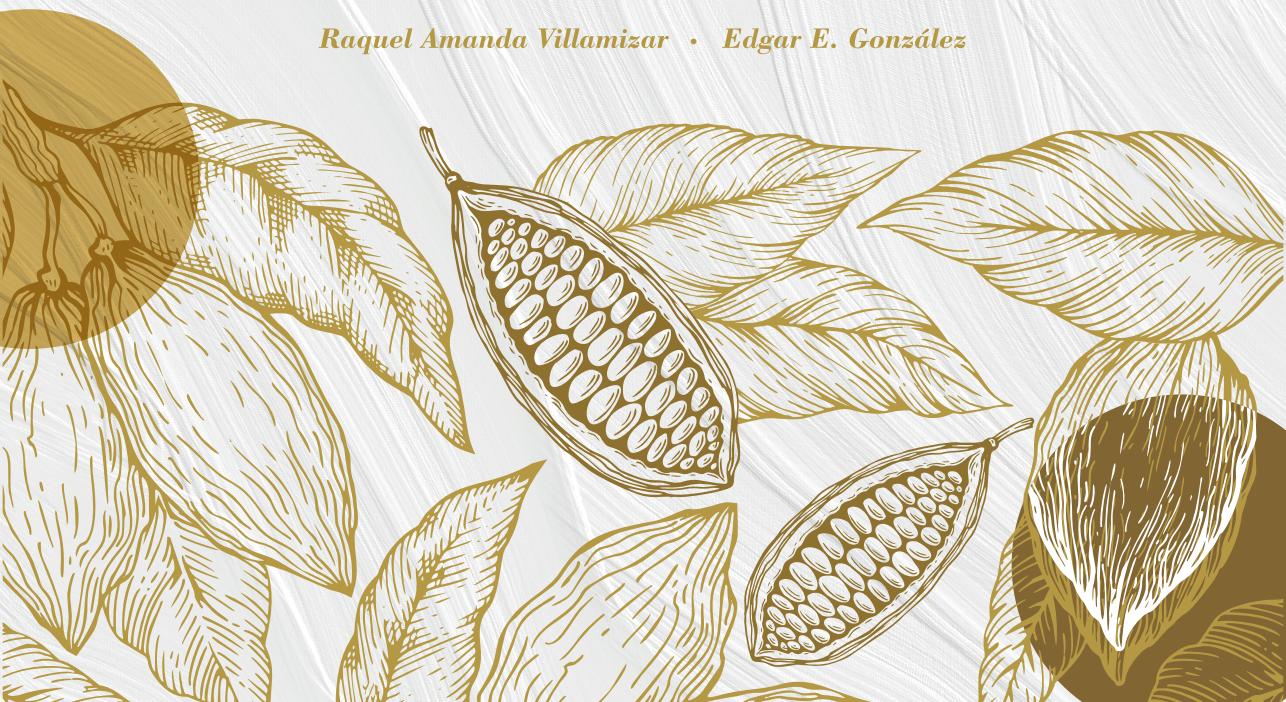




UNIVERSIDAD
DE PAMPLONA

BioNanotecnología aplicada al cultivo de *Theobroma cacao L.*

Raquel Amanda Villamizar • Edgar E. González



BioNanotecnología aplicada al
cultivo de *Theobroma cacao* L.

BioNanotecnología aplicada al cultivo de *Theobroma cacao L.*

Raquel Amanda Villamizar
Edgar E. González
Editores



BioNanotecnología aplicada al cultivo de Theobroma cacao L. /
Raquel Amanda Villamizar, Edgar E. González -- Pamplona:
Universidad de Pamplona. 2023.
144 p. ; 17 cm x 24 cm.

ISBN: 978-628-7656-01-7

© **Universidad de Pamplona**

Sede Principal Pamplona, Km 1 Vía Bucaramanga-
Ciudad Universitaria. Norte de Santander, Colombia.
www.unipamplona.edu.co
Teléfono: 6075685303

***BioNanotecnología aplicada al cultivo
de Theobroma cacao L.***

ISBN: 978-628-7656-01-7
Primera edición, agosto de 2023
Colección Biología y Ciencias Naturales
© Sello Editorial Unipamplona

Rector: Ivaldo Torres Chávez Ph.D

Vicerrector de Investigaciones: Aldo Pardo García Ph.D

Jefe Sello Editorial Unipamplona: Caterine Mojica Acevedo

Corrección de estilo: Andrea Durán Jaimes

Diseño y diagramación: Laura Angelica Buitrago Quintero

Todas las imágenes contenidas en este libro fueron diseñadas por los autores excepto algunas que fueron reproducidas con autorización. Esta publicación está sujeta a derechos de autor. Queda prohibida su reproducción total o parcial sin el permiso escrito de la Universidad de Pamplona

AUTORES



Ph.D. Raquel Amanda Villamizar

Microbióloga de la Universidad de Pamplona. Magister en Biología Molecular y Biotecnología de la misma universidad. Doctorado en Nanociencia y Nanotecnología de la Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España. Actualmente profesora asociada, directora del grupo de Investigación en Salud Pública y Epidemiología del programa de Medicina, Facultad de Salud, de la Universidad de Pamplona. Dentro de su trayectoria investigativa se destaca que es investigadora asociada y par evaluador reconocida por MinCiencias desde hace más de 10 años. Ha realizado estancias postdoctorales en la Universidad Técnica de Dinamarca, Dinamarca y la Universidad de Uppsala-Suecia, enfocadas a la síntesis, caracterización y funcionalización de nanomateriales inorgánicos para diferentes aplicaciones analíticas. Además, es miembro del comité asesor de Nanociencia y Nanotecnología Colombiana y miembro del comité editorial de la revista de divulgación científica para Latinoamérica e Iberoamérica “Nano Ciencia y Tecnología”. Ha publicado más de una veintena de artículos científicos en revistas nacionales e internacionales indexadas, h index Scopus 10. Además, cuenta con 2 libros de investigación y 1 capítulo de libro. La investigadora ha obtenido reconocimientos nacionales a la “Excelencia” tanto en docencia como en investigaciones realizadas enfocadas hacia la síntesis, caracterización y utilización de nanomateriales en el sector agro-alimentario y clínico.



Ph.D. Edgar E. González

Físico de la Universidad Nacional de Colombia con Maestría en Física, Doctorado en Física de la UAB. Posdoctorado en Nanotecnología en el ICNN, España. Actualmente se desempeña como director del Centro de Ciencia y Tecnología Nanoescalar “NanocyTec”. Es Miembro de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Es coordinador general de la Red Colombiana de Nanociencia y Nanotecnología. Editor asociado de la Revista de la Academia Colombiana de Ciencias. Editor en jefe de la Revista Journal Nano Science and Technology. Miembro del Inter Academy Partnership Science Education Program (IAP-SEP) Global Council. Es Investigador Senior de Minciencias. Investiga en el área de sistemas nanoscópicos, caos cuántico, información y computación cuántica, nanomateriales, específicamente en producción de nanoestructuras, caracterización, simulación, estudio de propiedades fisicoquímicas y su implementación en sistemas y procesos para producción de energía limpia, remediación ambiental, diagnóstico y tratamiento en el área de la salud. Es coautor de varias patentes en Nanotecnología y ha publicado en revistas de alto impacto como la Revista Science. Ha sido galardonado con premios nacionales e internacionales como el Special Award NanoTech Japón, entre otros.



Esp. Oscar José Parra Peñalosa

Biólogo de la Universidad de Pamplona, especialista en Aplicación de las tecnologías de la información y el conocimiento para la enseñanza y aprendizaje de la Universidad de Santander. Actualmente estudiante de Maestría en Biología Molecular y Biotecnología y docente de la Universidad de Pamplona. Hace parte del grupo de investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible “NANOSOST” categorizado A por Colciencias. Ha realizado estancia de investigación en la Universidad Autónoma de México relacionadas con su campo de formación en el área de Nano-Biotecnología. Se desempeña como docente universitario.

CONTENIDO

Prólogo	11
Introducción	13
Capítulo I: Bases teóricas	19
1. <i>Theobroma cacao</i> L.	21
1.1. Generalidades	21
1.2. Características edafoclimáticas del cultivo	23
1.3. Importancia internacional del cacao	24
1.4. Importancia nacional del cacao	25
2. Principales enfermedades que afectan la producción de cacao ...	27
2.1. Moniliasis	28
2.2. Escoba de bruja	30
2.3. Mazorca negra	31
3. Estrategias de control de enfermedades en el cultivo de cacao ...	33
3.1. Estrategias biotecnológicas	33
3.2. Estrategias nanotecnológicas	40
Capítulo II: Determinación de la incidencia puntual <i>in situ</i> de moniliasis y mazorca negra en algunas fincas cacaoteras del departamento de N. de S., Colombia	52
1. Introducción	55
2. Metodología	57
2.1. Toma de muestras	57
2.2. Determinación <i>in situ</i> de la incidencia puntual de moniliasis y mazorca negra	57
2.3. Aislamiento de los agentes etiológicos	58
3. Resultados	60
4. Discusión	62
5. Conclusiones	64

Capítulo III: Control biológico de patógenos primarios y secundarios del cacao usando <i>Trichoderma viride</i> y <i>Botryosphaeria quercum</i>, autóctonos aislados de cultivos en N. de S.	67
1. Introducción	69
2. Metodología	72
2.1. Preparación de stocks microorganismos patógenos	72
2.2. Hongos biocontroladores	72
2.3. Ensayo de inhibición con hongos antagonistas en planta	73
3. Resultados	73
4. Discusión	74
5. Conclusiones	76
Capítulo IV: Control biológico de <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Phytophthora palmivora</i> a través de aceites esenciales	81
1. Introducción	83
2. Metodología	85
2.1. Obtención de los hongos patógenos	85
2.2. Obtención de los aceites esenciales	85
2.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales	86
3. Resultados	86
4. Conclusiones	89
Capítulo V: Nanotecnología y su potencial impacto en la agricultura de cacao	95
1. Introducción	97
2. Metales pesados en cultivo de cacao	98
3. Contaminación del cacao por Cd y Pb	101
4. Nanotecnología para contribuir a la fertilización del cacao	103
5. Nanofertilizantes	105
6. Potencial impacto de la nanotecnología para monitoreo y remediación	107

7. Nanosensores para monitoreo y medición	108
Capítulo VI: Control Bio-Nano-Tecnológico de <i>Moniliophthora roreri</i> usando nanopartículas de plata	119
1. Introducción	121
2. Metodología	123
2.1. Obtención del hongo patógeno	123
2.2. Biosíntesis de AgNP usando cáscara de cacao	123
2.3. Caracterización UV-Vis de las AgNP	124
2.4. Preparación diluciones de las AgNP	124
2.5. Ensayos de inhibición con AgNP en medio de cultivo	124
2.6. Ensayos de inhibición con AgNP en planta	125
3. Resultados	125
4. Conclusiones	130
Galería fotográfica	133

PRÓLOGO



La Ciencia y la Tecnología son para la vida de los investigadores científicos, no solo una pasión sino uno de los motores del desarrollo de la sociedad. Por ello, encontrarse con un trabajo científico riguroso que pueda ser aplicado directamente a una problemática social, económica, ambiental y agrícola, es de particular interés y también motivo de admiración. El libro que tiene en sus manos representa el trabajo de varios años de desarrollo científico de un grupo de investigadores con una fuerte motivación por mejorar el conocimiento y entendimiento del cultivo de cacao, sus enfermedades más relevantes y la exploración de diversas metodologías para el control de dichas enfermedades.

La primera parte del libro nos conduce en un camino de conocimiento y descripción detallada del cultivo de cacao en Colombia, pero con una mirada complementaria al entendimiento de su cadena productiva a nivel mundial. El segundo capítulo, nos ofrece una descripción de las principales enfermedades de origen fúngico que afectan los cultivos de cacao en el departamento de Norte de Santander. En este capítulo podremos encontrar un diagnóstico detallado de moniliasis y mazorca negra, dos de las principales enfermedades de origen fúngico, tanto en mediciones *in vitro* como *in vivo*. Los capítulos tres al siete nos muestran una exploración de técnicas y tecnologías para el control de estas enfermedades. En particular, los capítulos tres y cuatro nos detallan el uso de microorganismos y hongos antagonistas y endofíticos como métodos biotecnológicos para el control de enfermedades en el cultivo de cacao. El capítulo cuarto explora el uso de aceites esenciales desde su obtención hasta su eficacia como método de control. Finalmente, los

capítulos quinto y sexto exploran las alternativas nanotecnológicas y su aplicación para el cultivo de cacao, así como la eficiencia en el uso de nanopartículas como método de control de enfermedades en dichos cultivos.

Por esto, el libro Bio-Nano-Tecnología aplicada al cultivo de *Theobroma cacao L.* no es solo un esfuerzo académico y científico, sino una obra que permite un mejor conocimiento sobre el cultivo de cacao y las nuevas tecnologías existentes para su control y mejoramiento, útil para científicos, investigadores, planeadores, tomadores de decisión y por supuesto para cultivadores de cacao.



Ph.D. Johann F. Osma

Profesor asociado
Ingeniería Biomédica
Universidad de los Andes

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es una especie nativa de los bosques húmedos tropicales ecuatoriales en América del Sur, la cual fue domesticada por nativos centroamericanos como lo fueron los Mayas y Aztecas (Nair, 2021). Este cultivo se establece en regiones cálidas y húmedas en latitudes que abarcan los 10°N y 10° S del Ecuador y su producción se destina principalmente a la obtención de granos como materia prima para la elaboración de chocolates y grasas, usados en las industrias alimenticias, farmacéuticas y cosmetológicas (Arvelo-Sánchez *et al.*, 2017). La producción de cacao a nivel mundial está liderada por el continente africano (destacándose Costa de Marfil, Ghana, Camerún y Nigeria) con un 63,2%, seguida por el continente asiático (principalmente Indonesia y Papúa Nueva Guinea) con un 17,4% y por último, el continente americano (especialmente Brasil, Ecuador, Perú, República dominicana y Colombia) con un 14,1% (Abbott *et al.*, 2018). En la actualidad el negocio del cacao es categorizado como una de las 6 principales actividades más lucrativas a nivel internacional, con una producción de 5 millones de toneladas anuales (Jung *et al.*, 2020), con un movimiento monetario de más de 200 millones de dólares anuales, del cual dependen más de 50 millones de personas (FAO, 2020) alrededor del mundo.

En Colombia, uno de los cultivos que se considera estratégico para el reemplazo de cultivos ilícitos es el cacao. De acuerdo a datos reportados por la Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales del Ministerio de Agricultura, en el país existen aproximadamente 65.341 familias cacaoteras y se encuentra distribuido en 27 departamentos y 422

municipios de la geografía nacional, siendo el departamento de Santander el mayor productor con un aporte del 41 % de la producción total, seguido de Antioquia con una participación del 9 %, y los departamentos de Arauca y Huila en tercer lugar con un 8 % respectivamente (FEDECACAO, 2022).

El cacao colombiano se destaca a nivel internacional por su aroma y sabor fino, características que posee aproximadamente el 95% de la producción nacional (Niño *et al.*, 2021), las cuales son de gran interés en el mercado internacional otorgando mayor calidad y precio (Antolínez-Sandoval *et al.*, 2020). Para el 2020, se generaron 63.416 Tn, con un área productiva de 188.000 ha, un promedio de 3 ha/cultivador (SIOC, 2020) y un incremento en 3.676 toneladas Tn, posicionándose como la mayor histórica del país; con ingresos por \$USD 29 millones (FEDECACAO, 2022). 11.148 Tn fueron exportadas a países como México, Italia, Bélgica, Holanda, Argentina, Estados Unidos y Malasia. Esto tuvo un gran impacto socioeconómico para la nación, ya que en el año 2020 se generaron 173.293 empleos entre directos e indirectos, de los cuales dependieron aproximadamente 65.000 familias (MADR, 2019).

Dentro de los desafíos de la cadena productiva de cacao, se encuentra el aumento del rendimiento de los cultivos, renovando cacaotales envejecidos que sean más tolerantes al cambio climático, así como resistentes al ataque de plagas. Se ha reportado que enfermedades como la moniliasis y la mazorca negra, ocasionadas por hongos fitopatógenos, pueden llegar a afectar más del 50% de la producción anual del país (Abbott *et al.*, 2018) que en términos de pérdida de grano comercial significaría más de 30.000 Tn, para una producción como la del año 2020.

No obstante, la ciencia avanza y con ella surgen nuevas estrategias para abordar este tipo de problemáticas. Desde una perspectiva biotecnológica, se encuentra el control biológico. Este se refiere al uso de sistemas biológicos y/o sus productos para hacer frente a un patógeno (Collinge *et al.*, 2022). Esta estrategia es amigable con el ambiente

puesto que los agentes biocontroladores usualmente, son obtenidos a partir del mismo microambiente donde se encuentra el cultivo, lo cual aumenta su posibilidad de adaptación y actividad *in situ*. Uno de los biofungicidas más empleados en la agricultura es el hongo *Trichoderma*, el cual es de fácil aplicación y bajo costo.

Desde otro enfoque más emergente se viene aplicando la Nanotecnología, la cual ha mostrado también tener grandes aplicaciones en la agricultura (Hugo *et al.*, 2018). Varios nanomateriales, de diferente naturaleza, han demostrado ser eficaces en la detección y remoción de patógenos, así como en el monitoreo de metales pesados en el cultivo de cacao (Acharya & Kumar, 2020). Las nanopartículas de plata (AgNP) por ejemplo, sintetizadas por métodos verdes, han sido empleadas como nanofungicidas altamente eficientes y eco-amigables, representando una gran ventaja frente a los métodos químicos convencionales, los cuales son usualmente contaminantes (Hugo *et al.*, 2018).

Por tanto, en este libro, producto de varios años de investigación del grupo de investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible “NANOSOST”, categorizado A de la Universidad de Pamplona, con aportes del Centro de Ciencia y Tecnología Nanoescalar “NanocyTec” presenta los resultados que se han venido obteniendo sobre el análisis de las enfermedades con mayor incidencia en algunas zonas cacaoteras del departamento Norte de Santander, así como los agentes etiológicos implicados en su producción. Haciendo uso del enfoque biotecnológico, se muestran detalles experimentales de un trabajo realizado con *Trichoderma viride*, *Botryosphaeria quercum* y varios aceites esenciales, como estrategias para el control biológico de estas enfermedades. Desde una óptica más disruptiva se relacionan diferentes tipos de nanomateriales y/o nanoconfiguraciones, que pueden ser empleados en la detección y remoción de metales pesados como el cadmio y el plomo, así como en la inhibición de hongos fitopatógenos que afectan este sistema agroforestal en la actualidad.

En este sentido, se pretende generar un material bibliográfico que pueda ser empleado por estudiantes, docentes, investigadores, técnicos

e interesados en el sector cacaotero; que de alguna manera promueva iniciativas conducentes al incremento de la productividad y competitividad del cultivo en el departamento Norte de Santander y por qué no, en el país.

REFERENCIAS

Abbott, P.C., Benjamin, T.J., Burniske, G.R., Croft, M.M., Fenton, M., Kelly, C.R., Lundy, M., Rodríguez-Camayo, F., Wilcox, M.D. (2018). Análisis de la cadena productiva de cacao en Colombia. *United States Agency for International Development - USAID*. Cali. CO. 208 p. <https://hdl.handle.net/10568/99089>

Acharya, A., & Kumar, P. (2020). Agriculture nanotechnology: Translating research outcome to field applications by in fluencing environmental sustainability. *Nanoimpact*, 19: 100232. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100232>

Akther, T., & Hemalatha, S. (2019). Mycosilver Nanoparticles : Synthesis , Characterization and its Efficacy against Plant Pathogenic Fungi. *BioNanoScience*, 9: 296–301. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-0607-y>

Antolinez-Sandoval, E.Y., Almanza-Merchán, P.J., Baraona-Rodríguez, A.F., Polanco-Díaz, E., & Serrano-Cely, P.A. (2020). Estado actual de la cacaoicultura: una revisión de sus principales limitantes. *Ciencia y Agricultura*, 17(2): 1–11. <https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n2.2020.10729>

Arvelo-Sánchez, M.Á., Gonzáles-León, D., Delgado-López, T., Maroto-Arce, S., Montoya-Rodríguez, P. (2017). Estado actual sobre la producción, el comercio y cultivo del cacao en América. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura*, 283 p. Recuperado de <https://repositorio.iica.int/handle/11324/2793>

Collinge, D.B., Jensen, D.F., Rabiey, M., Sarrocco, S., Shaw, M.W., & Shaw, R. (2022). Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction? *Plant Pathology*, 71(5): 1024–1047. <https://doi.org/10.1111/ppa.13555>

FAO. (2020). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*: El encanto del chocolate de origen ecuatoriano | FAO en Ecuador | Food and Agriculture Organization of the United Nations. El encanto del chocolate de origen ecuatoriano. Recuperado de: <http://www.fao.org/ecuador/noticias/detail-events/en/c/1295417/>

FEDECACAO. (2022). Producción nacional en toneladas en el 2021. Recuperado de <https://www.fedecacao.com.co/economianacional>

Hugo, R., Saldívar, L., Argüello, B.M., Villarreal, G.D., & Reyes, V. (2018). *Nanotechnology potential in sustainable agriculture*, 28 (2): 9–24. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1575>

Jung, J. M., Byeon, D., Kim, S.H., Jung, S., & Lee, W.H. (2020). Estimating economic damage to cocoa bean production with changes in the spatial distribution of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) in response to climate change. *Journal of Stored Products Research*, 89:101681. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101681>

MADR. (2019). Cadena de Cacao. In *Dirección de cadenas agrícolas y forestales*. Recuperado de <https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2019-12-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>

Nair, K. (2021). Cocoa (*Theobroma cacao* L.). In *Tree Crops, Harvesting Cash from the World's Important Cash Crops*. Springer. 978-3-030-62139-1 <https://doi.org/10.2307/1307684>

SIOC. (2020). Estrategia de Ordenamiento de la Producción, Cadena Productiva del Cacao y su Industria. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Recuperado de <https://sioc.minagricultura.gov.co/DocumentosContexto/S4128-Plan%20OP%20Cacao%202020.pdf>

Villamizar-Gallardo, R., Osma, J.F., & Ortíz-Rodríguez, O.O. (2019). Regional evaluation of fungal pathogen incidence in colombian cocoa crops. *Agriculture*, 9(3): 1–11. <https://doi.org/10.3390/agriculture9030044>



CAPÍTULO I

Bases teóricas



CAPÍTULO I

Bases teóricas

Raquel Amanda Villamizar Gallardo
Oscar José Parra Peñalosa

*Grupo de Investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible
Universidad de Pamplona, campus Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.*

1. *Theobroma cacao* L.

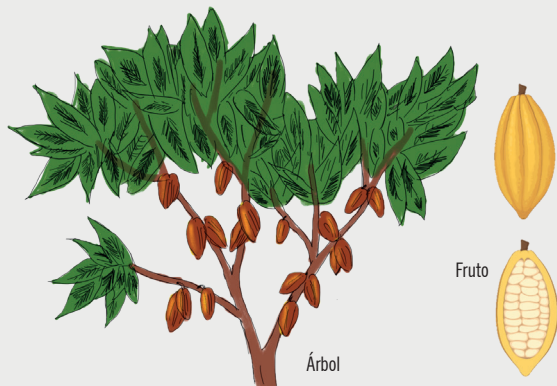
1.1. Generalidades

El cacao, es quizás el nombre más común por el que se conoce a uno de los cultivos de mayor importancia a nivel internacional, debido a que es la materia prima para la elaboración del chocolate. Su nombre científico es *Theobroma cacao* L. y es una especie perteneciente a la clase Magnoliopsida, orden Malvales y familia Malvacea (de Souza *et al.*, 2018). Esta especie es nativa de las regiones húmedas tropicales del centro y algunos países de América del Sur y su proceso de domesticación actualmente es debatido. Por una parte, diversos autores indican que fue llevado a cabo por la cultura Maya en Centro América (Salas Tornés & Hernández Sánchez, 2015), mientras que otros indican que la región del alto Amazonas es el centro de domesticación de cacao con mayor antigüedad conocido hasta el momento (Zarrillo *et al.*, 2018). Actualmente, esta especie se encuentra ampliamente extendida en África, Asia, Oceanía y América, y su cultivo se destina

principalmente a la producción de sus semillas las cuales son empleadas en las industrias alimenticias, cosméticas y farmacéuticas (Arvelo Sánchez *et al.*, 2017).

El cacao ha representado para estas culturas un símbolo de riqueza y espiritualidad, razón por la cual Carlos Linneo otorgó el nombre de “*Theobroma*” que significa “alimento de dioses” (Salas Tornés & Hernández Sánchez, 2015). Esta especie se caracteriza por ser un árbol perennifolio de talla pequeña que alcanza una altura de 4 a 7 metros cuando es cultivada, mientras que en su estado natural puede alcanzar hasta 20 metros de altura. Es hermafrodita, angiosperma y dicotiledónea. Sus hojas son coriáceas, alternas y elípticas. Sus flores se presentan en racimos a lo largo del tronco y ramas, las cuales son pentámeras, hermafroditas y actinóformas de color rosa, púrpura y blanca. Sus frutos son bayas grandes conocidas como mazorcas. Son carnosas, ovaladas, amarillas o púrpuras, los cuales contienen entre 30 y 40 semillas incrustadas en una masa de pulpa conocida como mucílago (Romero Hernández, 2016). El género *Theobroma* comprende 22 especies siendo *Theobroma cacao L.* la especie que más se

Figura 1
Árbol y fruto de Theobroma cacao L.



Fuente: Equipo investigador

destaca debido a su importancia económica (Antolínez Sandoval *et al.*, 2020).

Hasta hace pocos años existían solo tres tipologías de cultivares de cacao a saber; criollo, forastero y trinitario (Figura 2) (Arvelo Sánchez *et al.*, 2017). Los ejemplares de la tipología “criollo” se caracterizan por poseer un sabor suave y aromático. La forma de sus frutos es alargada de punta pronunciada y doblada donde sus semillas son poco pigmentadas y de gran tamaño. La tipología “forastero”, es la que domina la producción mundial, sus frutos son ovalados y

cortos con semillas aplanadas y cortas pigmentadas. Por último la tipología “trinitario”, son producto de la hibridación de los dos anteriores y son muy heterogéneos tanto genética como morfológicamente (Arvelo Sánchez *et al.*, 2017).

En la actualidad, a nivel nacional, la Federación Nacional de Cacaoteros que es la organización encargada de contribuir al desarrollo integral de este sector, ha registrado y caracterizado diversos clones como FEAR 5, FEC 2, FLE 2, FLE 3, FSA12, FSA 13, FSV 41, FTA 2 y FSV 155 (FEDECACAO, 2017). Los clones representan plantas idénticas genéticamente que se destacan por su tolerancia a ciertos factores ambientales y/o plagas.

Figura 2

Algunas de las tipologías de cultivares de cacao de mayor distribución



Fuente: Equipo investigador

1.2. Características edafoclimáticas del cultivo

Se refiere a las condiciones óptimas asociadas al suelo y el clima que inciden directamente sobre la productividad de un cultivo, con el fin de obtener el máximo potencial del mismo. Se ve expresado en número, tamaño y sabor de frutos, entre otras características de interés organoléptico (Tabla 1). La producción de cacao es altamente dependiente de la temperatura, lluvias y humedad relativa, y su variabilidad puede alterar el ciclo fisiológico del cultivo, haciéndolo más susceptible al padecimiento de plagas y enfermedades (Arvelo Sánchez *et al.*, 2017).

Tabla 1*Características edafoclimáticas del cultivo de cacao*

Variable	Referencia
Latitud	10°N - 10°S
Temperatura	18° - 32° C
Precipitación anual	1500 - 2600 mm
Humedad	70 - 85%
Altura	0 - 1200 msnm
Suelo	Franco arcilloso - Arenoso
pH del suelo	5.0 - 7.5

Fuente: Adaptado de (Arvelo Sánchez *et al.*, 2017).

1.3. Importancia internacional del cacao

El cultivo de cacao es uno de los cultivos de exportación de mayor importancia a nivel mundial, posicionándose en el puesto número tres, antecedido del café y el azúcar (Osorio-Guarín *et al.*, 2017). Tiene gran importancia tanto para países productores como consumidores y al estar limitado a ciertas condiciones edafoclimáticas, son pocos los países que pueden suplir dichas necesidades, representando para estos un gran valor en la economía de la nación (Gayi & Tsowou, 2016).

Su producción ha venido en aumento en los últimos años resultado de sus múltiples usos en la industria alimenticia, cosmética, farmacéutica; generando de esta forma, una mayor demanda y logrando así cifras históricas en su producción. En el año 2021, se superaron por primera vez los 5 millones de toneladas anuales (DGPA, 2021) (ICCO, 2022b).

De este cultivo dependen 50 millones de personas a nivel global, lo que lo convierte en una de las seis (6) principales actividades de mayor lucro, con un negocio que mueve más de 200 millones de dólares anuales (FAO, 2020).

La producción está liderada por el continente africano con un 77,4%, seguido del continente americano con un 17,8% y por último Asia y Oceanía con un 4,8% (Tabla 2) (ICCO, 2022b).

Tabla 2

Países productores de cacao a nivel internacional en el 2021

Continente	País	Producción (Miles de toneladas)	
<i>África</i>	Costa de Marfil	2248	
	Ghana	1047	
	Camerún	290	4044 (77,4%)
	Nigeria	290	
	Otros	170	
<i>América</i>	Ecuador	365	
	Brasil	200	930 (17,8 %)
	Otros	364	
<i>Asia y Occidente</i>	Indonesia	170	
	Papúa Nueva Guinea	42	253 (4,8%)
	Otros	41	

Fuente: Tomado y adaptado de (ICCO, 2022b).

1.4. Importancia nacional del cacao

El cultivo de cacao en Colombia juega un rol económico relevante considerándose como un sector empresarial estratégico (Agudelo *et al.*, 2022), donde el 95% de su producción es considerada por la Organización Internacional del Cacao (ICCO) como “cacao fino”. Esta producción es generada por un selecto grupo de países y es bastante apetecida en el mercado internacional, caracterizándose principalmente por su sabor, que es el resultado de factores intrínsecos de la planta, como de factores externos asociados al proceso de cultivo, siembra y procesamiento (ICCO, 2022a).

Este cultivo se ha convertido en los últimos años en prioridad para el gobierno colombiano, debido a que es uno de los que se considera podría impulsar el desarrollo de programas destinados a favorecer la paz en las regiones en posconflicto y a la sustitución de cultivos ilícitos producto del tratado de paz (Rodríguez-Medina *et al.*, 2019).

A lo largo del territorio nacional, aproximadamente 30 de los 32 departamentos que lo conforman producen cacao. Dentro de estos se destacan Santander, Arauca, Antioquia, Tolima y Huila, que abarcan más del 70% de la producción nacional. Los departamentos de Nariño, Cundinamarca, Meta, Cesar, y Norte de Santander aportan la restante.

Tabla 3

Departamentos con la mayor producción de cacao en Colombia en el 2021

Departamento	Toneladas	%
Santander	28,037	40,6
Arauca	7,894	11,4
Antioquia	6,661	9,6
Tolima	4,027	5,8
Huila	3,510	5,1
Nariño	3,480	5
Cundinamarca	2,608	3,8
Meta	2,239	3,2
Cesar	2,006	2,9
Norte de Santander	1,803	2,6

Fuente: (FEDECACAO, 2022b).

En el departamento de Norte de Santander, Colombia, la baja productividad y competitividad en la producción de cacao se atribuye entre muchas razones, a la escasa distribución de materiales biológicos tolerantes a plagas y en términos generales a la falta de un manejo integrado del cultivo, que hace que la región ocupe el décimo puesto dentro del ranking nacional de producción.

2. Principales enfermedades que afectan la producción de cacao

Al igual que otros cultivos, las plantas de cacao se encuentran expuestas a la contaminación y colonización por diversos microorganismos, siendo esta una de las principales limitantes de su producción (Delgado-Ospina *et al.*, 2021). Se estima que los microorganismos fitopatógenos del cacao, ocasionan una pérdida entre el 30% y 40 % de la productividad global (ICCO, 2021). La pérdida de sus frutos se da en gran proporción durante las doce semanas iniciales de su desarrollo, oscilando entre el 60% y 80% (Flores *et al.*, 2022). Estos pueden afectar cualquier etapa de procesamiento del cacao, alterando el rendimiento y por lo tanto, afectando el suministro y la calidad del grano, aspectos que modifican la relación entre oferta y demanda (Sousa Filho *et al.*, 2021).

La presencia de estas enfermedades se ve directamente favorecida por las condiciones climáticas; por un incorrecto manejo en la siembra o post-cosecha y por el genotipo del material empleado (Delgado-Ospina *et al.*, 2021). Varios de los microorganismos causantes de las enfermedades de mayor impacto en este cultivo son originarios del continente americano y han venido co-evolucionando con la planta; mientras que otros han saltado de otras especies y se han adaptado a las condiciones otorgadas por el árbol de cacao, generando de esta forma nuevas enfermedades antes no reportadas (Cilas & Bastide, 2020).

Dentro de las enfermedades que generan un mayor impacto en la producción de cacao tanto a una escala global como nacional, se reportan la moniliasis, siendo su agente etiológico el hongo *Moniliophthora roreri*; la escoba de bruja causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa* y la mazorca negra causada por el pseudo-hongo *Phytophthora* sp. En el caso de las dos primeros, son endémicos de este cultivo, mientras que el último tiene un amplio espectro de acción sobre gran variedad de plantas (ICCO, 2021). Estos microorganismos son altamente invasivos y la mayoría afecta directamente el fruto que sirve de sustrato para su reproducción y producción de esporas que son dispersadas a través de diversos mecanismos hasta llegar a

otros frutos y así continuar su ciclo hasta la colonización de gran parte de la producción (Tirado-Gallego *et al.*, 2016).

2.1. Moniliasis

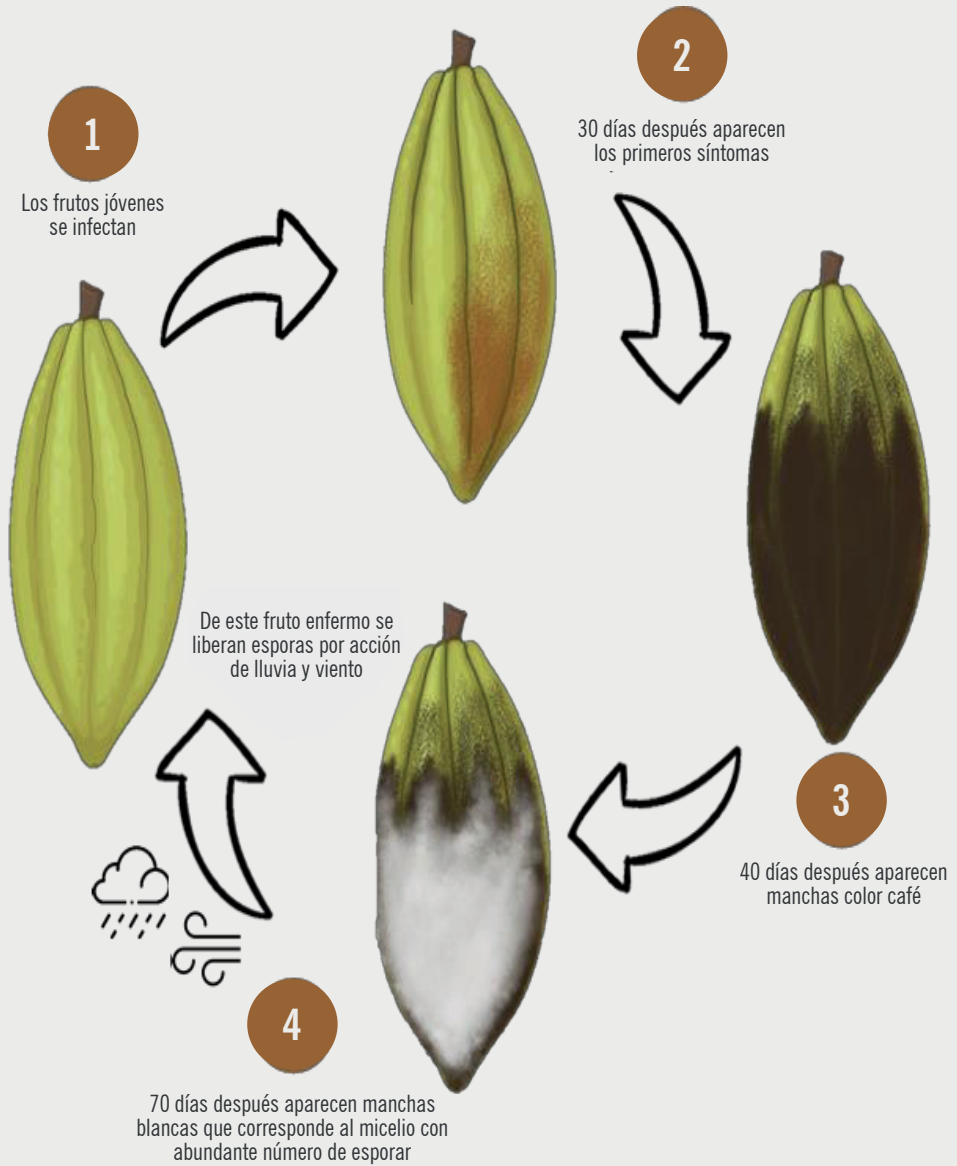
La moniliasis también conocida como pudrición acuosa, helada, mancha ceniza o enfermedad de Quevedo, es causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, un hongo que presenta septo doliporo y un evento único de esporogénesis basipetal (Arbelaez, 2010).

Esta enfermedad fúngica severa se encuentra en 11 países de América Latina y durante años, Ecuador fue considerado como el centro de origen de la enfermedad. No obstante, Phillips–Mora (2003) señaló que la moniliasis del cacao pudo aparecer por primera vez en Colombia, en el departamento de “Norte de Santander en 1817” y en 1851 en el departamento de Antioquia. A nivel latinoamericano y nacional, esta enfermedad es considerada como la principal causa de los bajos rendimientos del cultivo en las regiones productoras, llegando a ocasionar pérdidas de más del 40% de la producción (Antolínez Sandoval *et al.*, 2020).

El ciclo de vida de *Moniliophthora roreri* contiene dos fases, razón por la cual es categorizado como hemibiotrófico. Una primera fase se caracteriza porque se obtienen nutrientes a partir de células vivas denominada biotrófica. En la segunda se obtienen nutrientes a partir de células muertas y se denomina necrotrófica (Rozo Ortega, 2019). La progresión de una fase a la otra disminuye los macronutrientes disponibles llevando por consiguiente a la pérdida del fruto (Lorena *et al.*, 2022). Una vez el hongo se ha establecido, libera esporas a partir de un fruto enfermo que llegan a través del viento principalmente a uno sano, siendo más susceptibles los más jóvenes. Las esporas ingresan a través de la cutícula o estomas colonizando los tejidos intercelularmente. En esta fase biotrófica se generan malformaciones en los frutos. La duración es de aproximadamente 45 a 90 días antes de iniciar la fase necrotrófica, donde se da la colonización intracelular que provoca la muerte del tejido hasta avanzar a gran parte del fruto. Posterior a esto, se forma una estructura lanosa de color crema indicadora de gran número de esporas maduras (Bailey *et al.*, 2016) (Figura 3).

Figura 3

Ciclo de vida de la moniliasis en cacao



Fuente: Equipo investigador

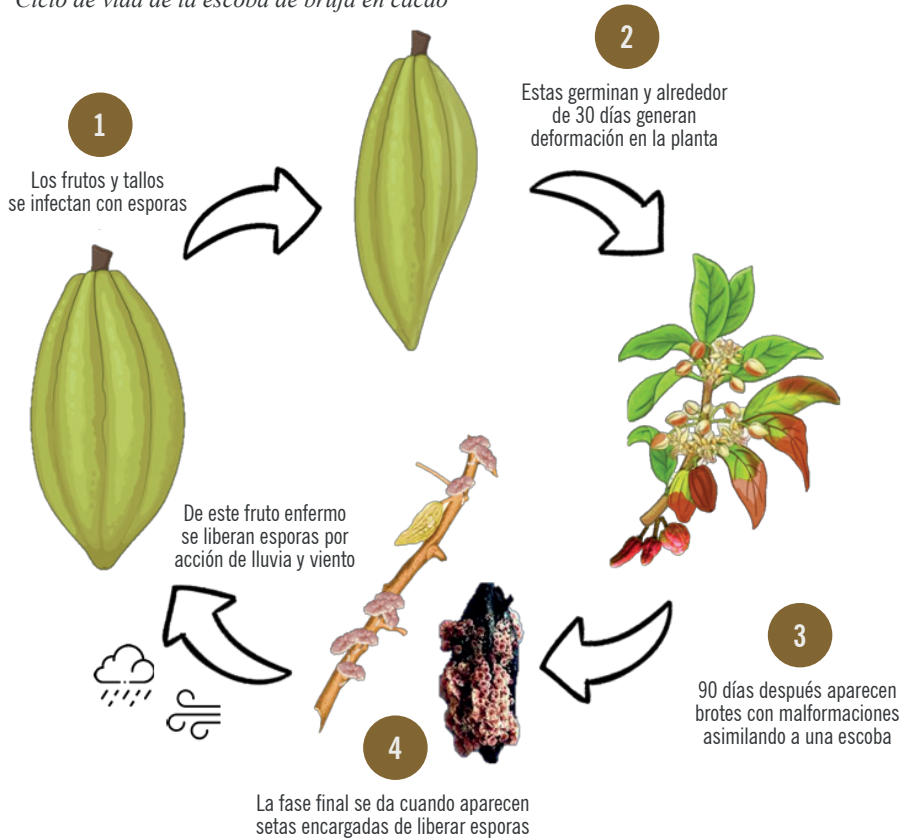
2.2. Escoba de bruja

Es una enfermedad compleja y difícil de controlar que ocasiona grandes pérdidas en el cultivo de cacao, principalmente en la región suramericana. Es ocasionada por el hongo *Moniliophthora perniciosa*, que al igual que *Moniliophthora roreri* es originario y endémico de Suramérica, específicamente de Brasil. La denominación se debe a las malformaciones que ocasiona brotes, cojines y vainas florales, que barre o cubre varios estadios de desarrollo de la planta (Lisboa *et al.*, 2020), e incluso puede llegar también a afectar a distintas especies de las familias *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Bigoniaceae* y *Malpighiaceae* (Másmela-Mendoza, 2019). Los biotipos de este hongo son C, S, L y B, siendo el primero específico para la familia *Malvaceae* que infectan a los géneros *Theobroma* y *Herrania* (Barbosa *et al.*, 2018).

Este hongo patógeno también presenta un ciclo de vida hemibiotrófico con dos etapas distintas de infección. Una fase biotrófica, que se caracteriza por el crecimiento de micelio que coloniza el espacio intercelular y una fase necrotrófica, que invade el tejido a nivel intracelular, provocando una necrosis y por ende muerte de los tejidos involucrados (Barbosa *et al.*, 2018). El ciclo de vida de este patógeno inicia cuando una basidiospora - que es el propágulo infeccioso- alcanza los tejidos en crecimiento o meristemáticos. Allí las hifas monocarióticas se desarrollan y penetran hacia la parte intercelular por estomas o heridas, dando paso a la fase biotrófica que puede cursar con diversa sintomatología dependiendo del órgano infectado, genotipo y condiciones ambientales (Barsottini *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2022). Esta fase puede llegar a durar de 30 a 60 días antes de dar paso a la fase necrotrófica, donde el hongo adquiere unas características específicas como lo es la producción de micelio dicariótico, el cual es saprófito e infecta el tejido a nivel intracelular. Los períodos de humedad y sequía dan paso a la formación de basidiocarpos, que a su vez generan basidiosporas y el ciclo vuelve a iniciar (Reyes Sanabria, 2019) (Figura 4).

Figura 4

Ciclo de vida de la escoba de bruja en cacao



Fuente: Equipo investigador

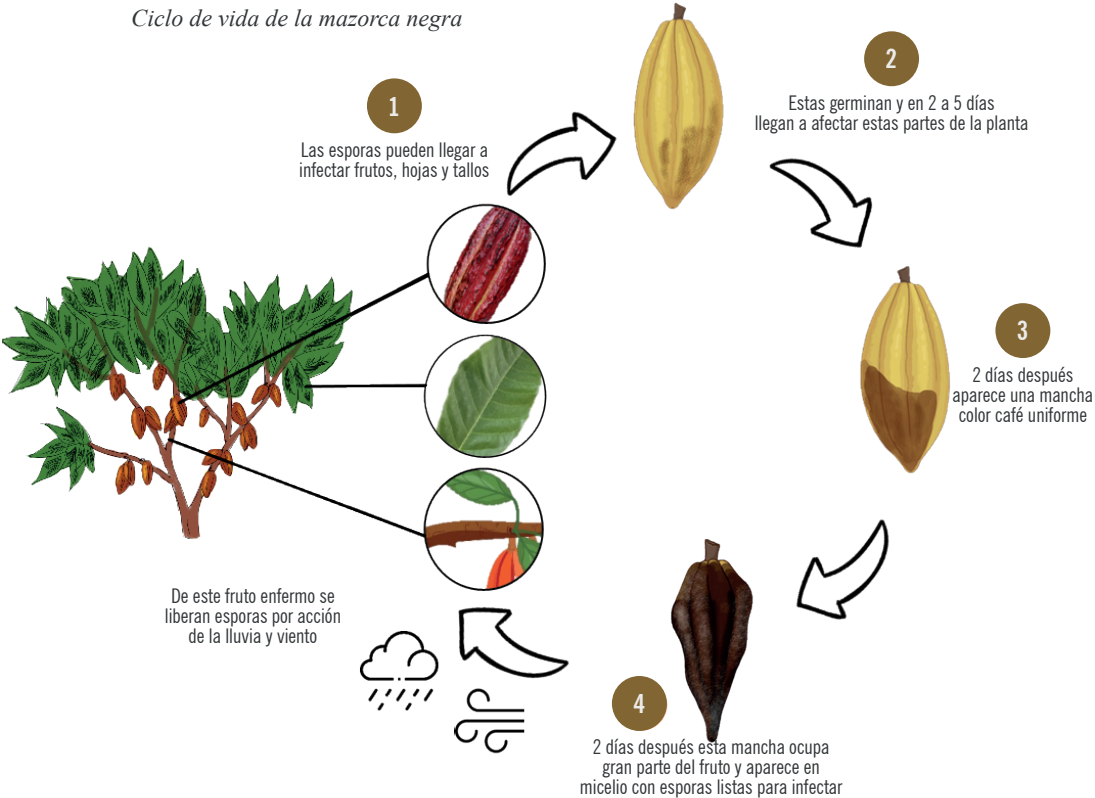
2.3. Mazorca negra

La mazorca negra o pudrición de la vaina negra, es la enfermedad que más afecta el cultivo de cacao a nivel global (Pérez-Vicente, 2018). El agente etiológico asociado es el microorganismo *Phytophthora* sp., el cual es un pseudo-hongo perteneciente a la clase Oomicetos con características similares a los hongos (Perrine-Walker, 2020). Esta enfermedad puede llegar a ocasionar pérdidas en más del 50% de la producción, incluso superiores, ya que puede verse favorecida por períodos de alta humedad (Cárdenas *et al.*, 2017; Tocafundo *et al.*, 2021).

Suele atacar a distintas especies de plantas en diferentes estados de desarrollo, llegando a diversos órganos como raíces, hojas, tallos y frutos, ocasionando una necrosis del tejido (Perrine-Walker, 2020). El ciclo de vida de este patógeno inicia con propágulos ambientales o de frutos ya infectados, los cuales pueden llegar a contener millones de zoosporas (esporas móviles) que al entrar en contacto con agentes de dispersión y con ayuda de los flagelos que poseen, colonizan los frutos o cualquier otro órgano de la planta que esté en buen estado.

Estas estructuras sirven como sustrato para la reproducción del microorganismo el cual ocasiona necrosis, generando inóculos que inician nuevamente el ciclo (Nembot *et al.*, 2017; Solis *et al.*, 2021) (Figura 5).

Figura 5
Ciclo de vida de la mazorca negra



Fuente: Equipo investigador

3. Estrategias de control de enfermedades en el cultivo de cacao

La vigilancia y control de las enfermedades que afectan el cultivo del cacao, es un factor determinante para garantizar el éxito de las cosechas. Existen diversas prácticas que pueden tener distintos objetivos de acuerdo al tipo, condiciones ambientales y estado del patógeno que esté atacando al cultivo. De acuerdo al tipo de acción que se ejercerá sobre el organismo a controlar (por ejemplo evitar, excluir, erradicar, proteger y/o generar resistencia) se emplearán estrategias químicas, físicas y/o biológicas (Rasool *et al.*, 2022). Las dos primeras son altamente eficaces y son las de mayor uso pero su costo suele ser elevado, a la vez, que genera gran impacto en el medio ambiente y la salud humana; pueden bioacumularse e inclusive inducir resistencia en patógenos y llegar a alterar microorganismos benéficos del suelo. En contraste, los mecanismos biológicos se caracterizan por usar organismos y/o sus productos metabólicos con alta eficacia, siendo más atractivos y prometedores desde el punto de vista de sustentabilidad de los cultivos (Singh *et al.*, 2021).

3.1. Estrategias biotecnológicas

3.1.1. Microorganismos biocontroladores

El concepto de control biológico usando microorganismos data desde hace 4000 años en Egipto. Sin embargo, su estudio de manera más avanzada no empezó hasta el siglo XIX (Waage J.K., *et al.*, 1988). El descubrimiento de que algunas enfermedades en el suelo eran mitigadas por *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *Ampelomyces quisqualis* Ces, y otros microorganismos antagonistas, han estimulado significativamente su investigación (Miljako-vić D. *et al.*, 2020).

Este método se basa en la utilización de agentes biocontroladores (de su sigla en inglés biological control agents “BCAs”), los cuales mejoran la inmunidad del hospedero y/o modifican el ambiente a través de los efectos beneficiosos de su citología y/o metabolitos. Un vasto número de BCAs han sido caracterizados e incluyen microorganismos benéficos, inductores de

plantas, metabolitos microbianos, entre otros (Pieterse C., 2014). La utilización de BCAs ofrece varias ventajas tales como: 1) su alta especificidad para un grupo de patógenos y por tanto, su bajo impacto sobre el ecosistema circundante 2) su capacidad de auto-mantenimiento por largos períodos de tiempo en el lugar de aplicación sin alterar su actividad (3) su capacidad para evitar la sobre-expresión del sistema inmunológico de la planta, haciendo que esta optimice el uso de energía para procesos más importantes relacionados como su crecimiento y productividad (Deng Y. *et al.*, 2017).

De acuerdo al modo de acción, algunos BCAs pueden clasificarse entre otros, como supresores de patógenos comportándose como hiperparásitos que emplean la antibiosis para matar directamente al patógeno, o para dejarlo sin energía y por tanto metabólicamente inactivo. Otros compiten por nicho y nutrientes, liberando compuestos antimicrobianos (Hou *et al.*, 2020). Sin embargo, la eficiencia de los BCAs se puede ver afectada por factores bióticos y abióticos. Los patógenos pueden llegar a desarrollar resistencia cuando los tiempos de exposición al agente biocontrolador son prolongados. Es así como se requieren estudios continuos sobre la interacción de BCAs con plantas, patógenos y el ambiente, creando la necesidad de aislarlos y aplicarlos en el mismo ecosistema de procedencia con la finalidad de aumentar su efectividad.

En el cultivo de cacao se han empleado microorganismos biocontroladores capaces de inhibir el crecimiento de fitopatógenos (Syamsuddin *et al.*, 2021., Larbi-Koranteng *et al.*, 2020., Ferraz *et al.*, 2019). Se ha reportado especialmente el uso del género *Trichoderma* y *Clonostachys*, los cuales generan una relación simbiótica con el huésped. Este mecanismo representa grandes ventajas ya que no implican el uso de sustancias perjudiciales para el entorno e inclusive pueden llegar a inducir la expresión de genes en la planta aumentando la resistencia a diversos factores (Bailey & Meinhardt, 2016). De igual forma, se ha explorado el uso de hongos endófitos los cuales son ampliamente reconocidos por su capacidad de penetrar y colonizar el huésped, promoviendo la síntesis de compuestos biológicos que favorecen el crecimiento de las plantas y, por tanto, su capacidad de defensa (Mejía *et al.*, 2021., Villamizar *et al.*, 2017).

3.1.2. Aceites esenciales

Estos compuestos se definen como mezclas complejas de bajo peso molecular, volátiles y con propiedades aromáticas. Su composición varía en función del método de extracción empleado, el tipo y la especie de planta de la que se deriven, la composición del suelo donde se cultivan, así como el clima que puede influir sobre la cantidad de metabolito biosintetizado (Parrish *et al.*, 2020).

Se encuentran casi exclusivamente en plantas superiores, asociadas a un número limitado de familias dentro de las que se destacan *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae*, entre otras. La capacidad para biosintetizar y acumular moléculas aromáticas está relacionada con la presencia de estructuras histológicas como tricomas glandulares, cavidades secretoras, conductos resinosos, con lo cual su composición variará cualitativa y cuantitativamente en función de la planta (AEMPS, 2018).

3.1.2.1. Métodos de extracción

Varias investigaciones, han demostrado que diferentes métodos de extracción pueden producir aceites esenciales con un perfil organoléptico más natural sin modificar su actividad biológica. La fabricación de aceites esenciales (AE) y el método usado para su extracción van en función del material botánico empleado, el estado y la forma. La proporción de aceite esencial en la materia prima vegetal puede variar dependiendo de la planta y puede oscilar entre un 0,015 % y más de un 20 %. Por ejemplo, a partir de 10 kg de clavo se pueden obtener hasta 2,2 kg de aceite esencial (AEMPS, 2018). Finalmente, el método de extracción es uno de los factores claves que determina la calidad del producto final ya que un método inapropiado puede conducir a daño o alteración del quimiotipo y, como consecuencia, la pérdida de su bioactividad y características naturales tales como la viscosidad, el color, la solubilidad, la volatilidad, puede enriquecer o reducir la presencia de algunos componentes. En la tabla 4 se presentan algunos de los métodos de extracción de aceites esenciales más comúnmente empleados por industrias y laboratorios de investigación.

Tabla 4*Descripción de algunos métodos empleados para la extracción de AE*

Método	Principio	Material vegetal
Destilación por arrastre de vapor	Es el método más comúnmente empleado para extraer AE, logrando obtener hasta un 93 % del aceite. Procedimentalmente, la planta se coloca en un recipiente el cual se calienta mediante vapor de agua. El calor aplicado es la principal responsable de romper la pared celular de la planta y de esta manera, los aceites esenciales son liberados. Puede durar entre 1 y 10 h y la cantidad de aceite producido depende de la duración del tiempo de destilación, la temperatura, la presión y el tipo de material vegetal. Los inconvenientes son: hidrólisis de ésteres a alcoholes y ácidos, impurezas que ocasionan olores inaceptables y tiempos muy largos de extracción.	Todo tipo de material vegetal de la planta
Prensado en frío	Proceso físico durante el cual las glándulas de aceite esencial de la piel y las cutículas se rompen para que se libere el aceite. Este proceso da como resultado la producción de una emulsión acuosa, que posteriormente se centrifuga para separar el aceite esencial. Este método es ideal cuando el material vegetal contiene aldehídos los cuales son inestables al aumento de la temperatura.	Cítricos
Extracción con solventes	Se usa para extraer aceites esenciales que son térmicamente lábiles. Se utilizan temperaturas más bajas durante el proceso. El material vegetal se coloca en un baño de disolvente que disuelve los componentes de interés. Para separar el aceite esencial, se realizan las operaciones de filtración y destilación. Los solventes que se usan comúnmente para la extracción son: alcohol, hexano, etanol, éter de petróleo y metanol. La extracción con solvente es económica y relativamente rápida.	Flores
Enfloración	Extracción mediante grasa fría inodora y purificada. Se envuelve el material vegetal con el fin de extraer olores. El proceso se repite durante períodos muy largos hasta que se alcanza la saturación de la grasa. Posteriormente, se recoge la grasa y se extrae con alcohol. Según los estándares actuales, es un método costoso, laborioso y requiere mucho tiempo. No parece tener ninguna aplicación para los aceites esenciales utilizados en la industria alimentaria y es prácticamente obsoleto en la actualidad.	Flores

Método	Principio	Material vegetal
Extracción con fluidos supercríticos	Este método es más selectivo en la extracción al poderse controlar diferentes variables como: temperatura, control del flujo, manejo de la presión, mayor difusión; es decir, ingresa fácilmente a materiales sólidos porosos facilitando la transferencia de masa. Requiere menor cantidad de solventes orgánicos y emplea fluidos no tóxicos (CO ₂).	Todo tipo de material vegetal de la planta, especialmente cortezas, tallos y raíces
Extracción asistida por microondas	Emplea un mecanismo de calentamiento único basado en la fricción. Se han derivado varias técnicas aprovechando dicha transferencia de calor. Investigadores han combinado microondas con métodos convencionales desarrollando nuevos métodos como: extracción por solvente asistida por microondas, hidrodestilación por microondas al vacío, hidrodestilación por microondas, destilación por microondas de aire comprimido y destilación por vapor acelerada por microondas. En general todos los métodos tienen costo, es razonable, buen desempeño en condiciones atmosféricas y mayores rendimientos, pero requiere mayor cantidad de solvente según la combinación de la técnica que se aplique.	Todo tipo de material vegetal de la planta
Proceso de caída de presión controlado instantáneo	Se basa en el procesamiento termo-mecánico provocado por someter el producto a una rápida transición de alta presión de vapor a vacío. El procesamiento mejora la difusividad global y la disponibilidad del líquido en la planta y no requiere el uso de solventes. Los tiempos de extracción son bajos, consume menores niveles de energía y uso de agua.	Todo tipo de material vegetal de la planta
Extracción asistida por ultrasonido	Se basa en la cavitación, es decir, producción de burbujas microscópicas. Cuando las burbujas aumentan de tamaño colapsan violentamente e inducen fuerzas mecánicas que conducen al daño de la membrana celular, lo que da como resultado un alto rendimiento de materiales extraídos y una rápida tasa de extracción. Este método se puede también combinar con otras técnicas, como la extracción con fluidos supercríticos.	Todo tipo de material vegetal de la planta

Fuente: Adaptado de (Stratakos and Koidis, 2016).

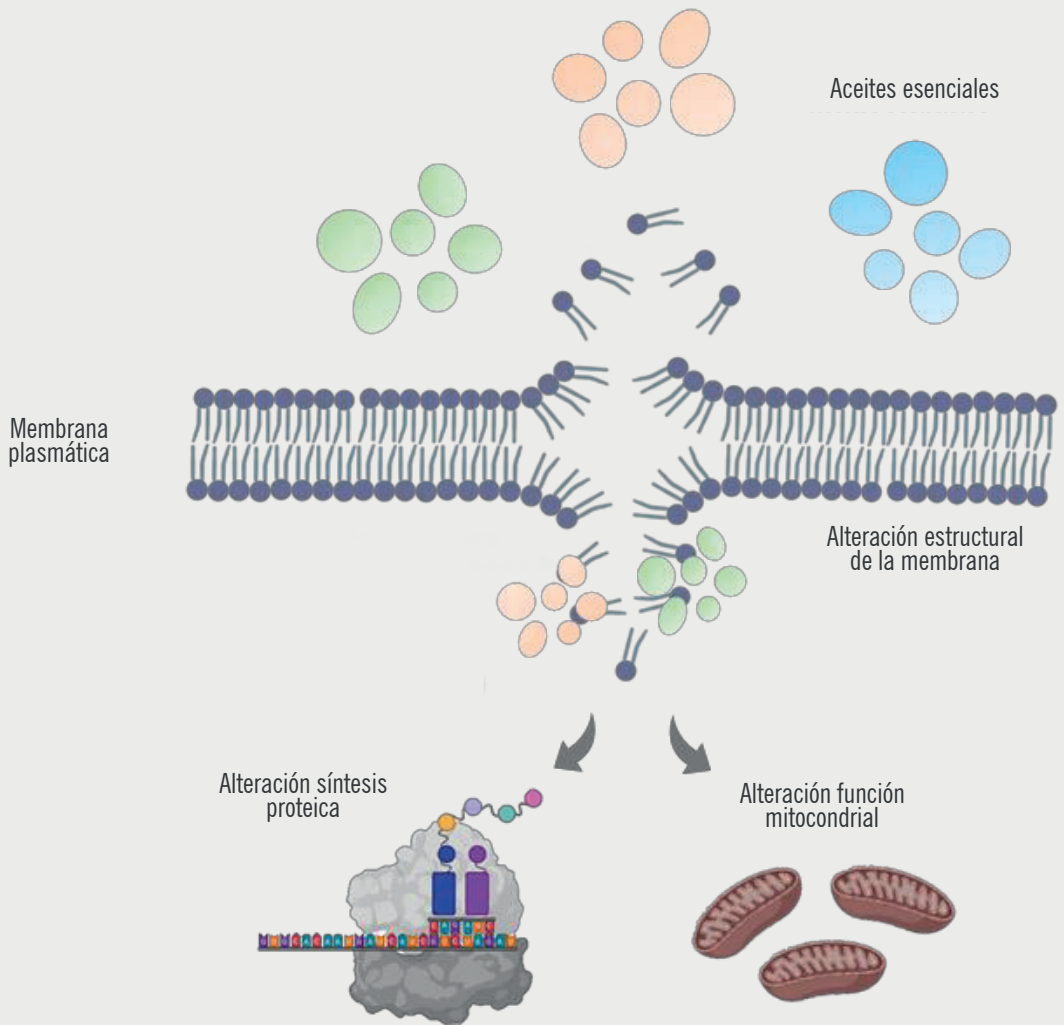
3.1.2.2. Mecanismo de acción

Una de las características más importante de los AE es su hidrofobicidad. Esto hace que sean capaces de penetrar a través de las membranas celulares, alterando sus estructuras y haciéndolas más permeables. La pérdida excesiva o salida de moléculas críticas pueden llevar a la muerte celular (Sánchez, 2011). La actividad microbicida de los aceites esenciales se atribuye a la relación de terpenos/terpenoides, los cuales, debido a su naturaleza altamente lipofílica y su bajo peso molecular son capaces de causar disrupción a nivel de membrana celular, produciendo la muerte o inhibiendo la esporulación y germinación de las esporas fúngicas (Nazzaro *et al.*, 2017).

Además, los AE exhiben actividad antioxidante, son reclutadores de radicales libres, agentes reductores, terminadores de peróxido, inhibidores de la formación de oxígeno y fijadores de iones metálicos de transición, entre otros. Esto hace que interfieran con los procesos de respiración y reparación celular conduciendo a la lisis. La inhibición específicamente de hongos fitopatógenos por acción de los AE ha sido reportada por varios autores, quienes concluyen la afectación sobre la pared celular, la interrupción de la formación del ATP, la disrupción de la membrana plasmática y la desorganización estructural de la mitocondria (Figura 6), bloqueando las reacciones enzimáticas que ocurren en la central energética de la célula (Gómez-López A *et al.*, 2020).

Figura 6

Representación esquemática del efecto de los AE sobre la ultra estructura celular microbiana



Fuente: Equipo investigador

3.1.2.3. Mecanismo de acción

Tabla 5

Usos más frecuentes de los AE

Actividad	Usos
Productos cosméticos	Elaboración de jabones, detergentes y perfumes. En perfumes finos y novedosos se requieren quimiotipos concretos de salvia, lavanda y tomillo.
Medicina y farmacia	Se requiere AE con alto potencial de agentes medicinales, expectorante para el tratamiento de la tos y bronquitis (eucalipto), agentes antimicrobianos (salvia, árbol del té y clavo), descongestionante de las vías respiratorias (menta piperita), y como carminativo (anís). El aceite de clavo se utiliza en odontología por sus propiedades antisépticas y analgésicas, mientras que el aceite de árbol de té se utiliza en dermatología como agente antiacné debido a su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas, aromatizar preparaciones farmacéuticas, así como mejorar su sabor.
Alimentos	Los AE actúan como antioxidantes, antifúngicos y antibacterianos alargando la vida útil de los alimentos. Se requiere un buen conocimiento de las propiedades del AE, incluida la sensibilidad a los microorganismos objetivo, el modo de acción específico, su potencial antimicrobiano y el efecto de los componentes de la matriz alimentaria. Otro uso en los alimentos, es como aditivo en sabores y olores que llegan a conferir a estos productos.
Agricultura	Los AE actúan como agentes fitotóxicos gracias a la presencia de terpenos oxigenados, mono y sesquiterpenos. Debido a esto, se consideran excelentes herbicidas y microbicidas.

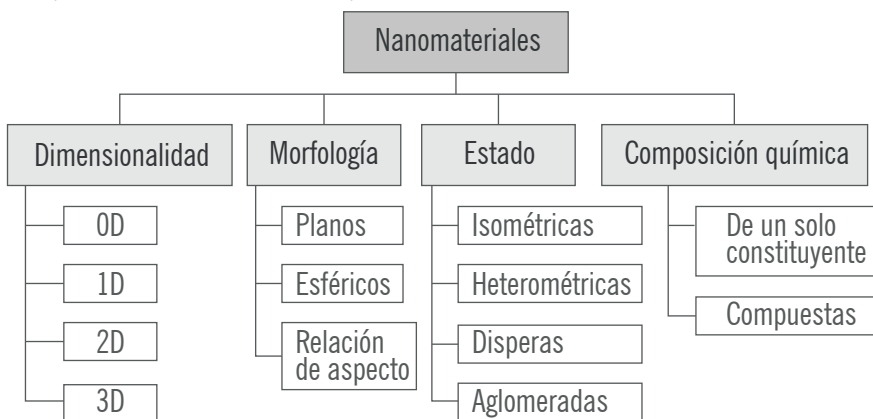
Fuente: Adaptado de (Abd-Elgawad *et al.*, 2021; Sharma S *et al.*, 2021).

3.2. Estrategias Nanotecnológicas

La Nanotecnología es un área de la ciencia que se encarga de diseñar, manipular, y caracterizar átomos a escala nanométrica (1 a 100 nm). En este rango de tamaño, la materia exhibe propiedades químicas, mecánicas, eléctricas y ópticas únicas, permitiéndole un amplio abanico de aplicaciones en áreas como la Ingeniería, Medicina, Industria de Alimentos, Industria Textil, Robótica, Informática, entre otras (Neme *et al.*, 2021). Los nanomateriales que se obtienen a través de la Nanotecnología se pueden clasificar en función de su dimensionalidad, morfología, estado y composición química (Saleh, 2020), como lo muestra la figura 7.

Figura 7

Clasificación de nanomateriales en función de varios criterios



Fuente: Tomado y adaptado de (Saleh, 2020).

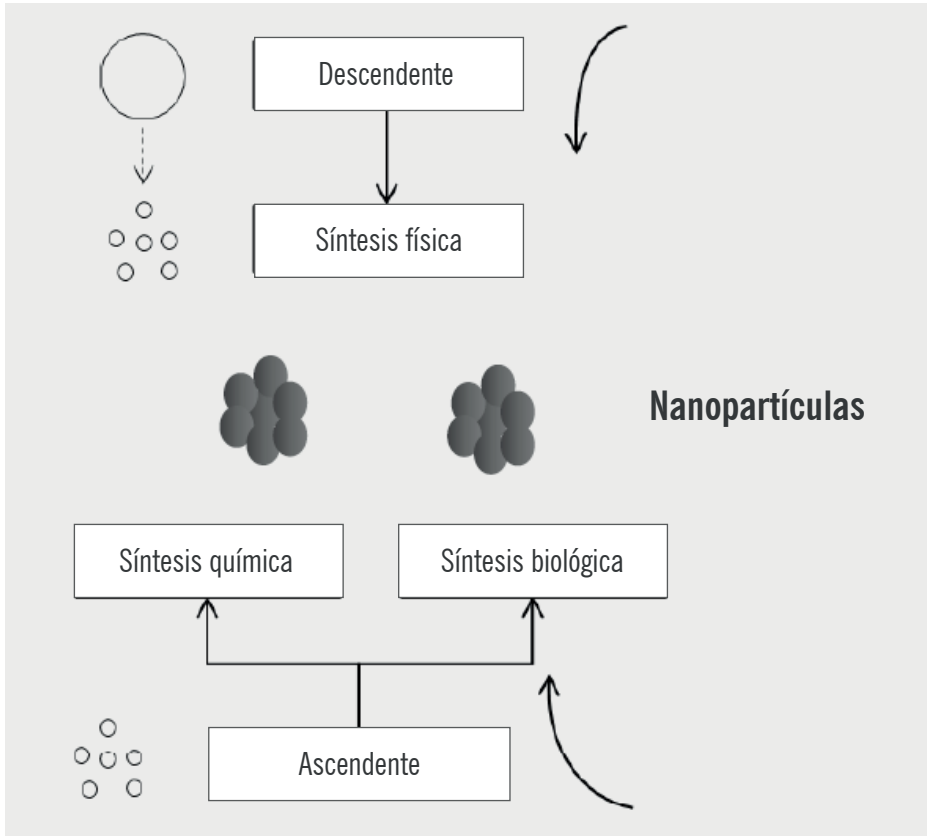
Un tipo de nanomaterial de amplia distribución en diferentes industrias son las nanopartículas (NPs). Estas, se definen como clusters de átomos que oscilan entre 1 a 100 nm (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2020). Existen nanopartículas a base de carbón, orgánicas e inorgánicas. Dentro de este último grupo se encuentran las metálicas que se caracterizan por contener un núcleo ya sea de un metal inorgánico u óxidos de metal (Khan, 2020). Entre los metales que comúnmente se emplean para la elaboración de estos elementos están el Au, Ag, Pt, Zn, Ni y Cu, cada uno con características específicas que le otorgan potenciales aplicaciones en diversos campos como la agricultura, medicina, farmacéutica, industria textil, entre otras (Paramo *et al.*, 2020).

3.2.1. Síntesis de nanopartículas

La obtención de nanopartículas se lleva a cabo mediante diversas técnicas clasificadas en procesos físicos, químicos, y biológicos, que a su vez pueden dividirse en dos enfoques; uno conocido como “*Top down*” o descendente y otro “*Bottom up*” o ascendente. Usualmente las técnicas físicas son categorizadas como enfoques descendentes debido a que se parte de estructuras de gran tamaño hasta descomponerlas en sus piezas más pequeñas. En contraste, las técnicas biológicas y químicas son categorizadas como enfoques ascendentes donde se parte de estructuras atómicas hasta la formación de las NPs (Figura 8) (Zhang *et al.*, 2020; Salem *et al.*, 2022).

Figura 8

Acercamientos para la síntesis de nanopartículas



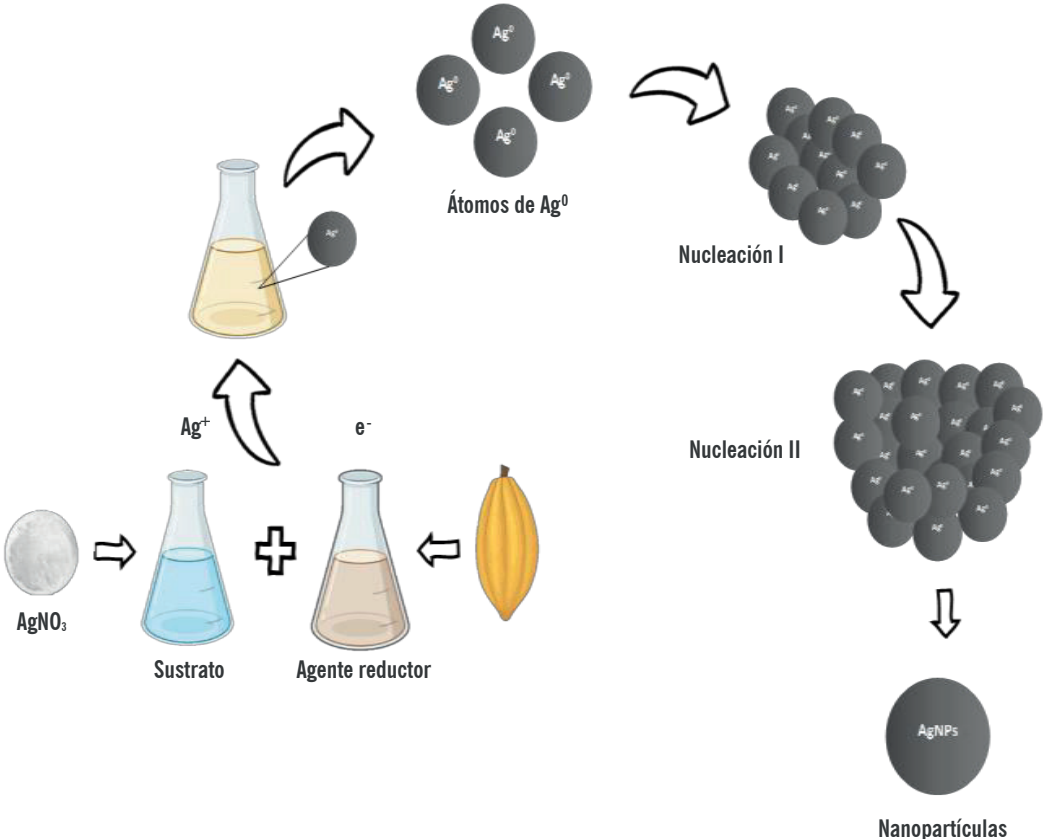
Fuente: Equipo investigador

Las técnicas de síntesis biológica involucran el uso de organismos vivos y/o sus partes, a partir de los cuales se obtienen los agentes reductores implicados en la formación de NPs (Rana *et al.*, 2020). Algunos agentes reductores biológicos pueden obtenerse a partir de bacterias, hongos, algas y plantas (Xu *et al.*, 2020). En el caso de la utilización de algas y plantas, la síntesis se denomina síntesis verde y es un campo emergente de la nanotecnología conocido como Fito-Nanotecnología. (Salem & Fouda, 2021). Este enfoque ha venido ganando relevancia por encima de las técnicas de síntesis química y física, debido a que los procesos se llevan a cabo a temperatura ambiente

y no genera residuos químicos, con lo cual es más amigable con el medio ambiente y de sencillo escalado (Jamkhande *et al.*, 2019).

La síntesis verde de nanopartículas a su vez, puede realizarse a través de dos vías. Una conocida como “biorreducción”, en la cual los iones metálicos son reducidos químicamente debido a la presencia de los componentes celulares de los organismos empleados (Figura 9), y otro conocido como “biosorción”, donde los iones metálicos se unen directamente a una estructura del organismo permitiendo de esta manera la formación de complejos estables en forma de NP (Jamkhande *et al.*, 2019).

Figura 9
Síntesis verde de nanopartículas por biorreducción



Fuente: Equipo investigador

En el cultivo de cacao las aplicaciones nanotecnológicas están siendo enfocadas al igual que el resto del sector agrícola, el uso de nanoformulaciones que minimicen la pérdida de nutrientes durante la fertilización, incrementen la germinación de semillas, provean estrategias de uso racional de los sistemas hídricos y, por tanto, reduzcan los impactos ambientales (Kona-ppa *et al.*, 2021). Para los primeros, la tecnología nanoescalar ofrece mejorar sustancialmente los procesos de liberación controlada, afrontando así los problemas de carencia o exceso de fertilizante (Salazar *et al.*, 2019). Entre tanto, los nanopesticidas van enfocados especialmente al control de enfermedades, ya que se ha demostrado que dependiendo de su naturaleza, pueden mitigar y/o impedir el crecimiento de organismos fitopatógenos y por tanto ayudan en el control de plagas que afectan el cultivo (Villamizar-Gallardo *et al.*, 2016).

REFERENCIAS

Abd-ElGawad, A.M., Elshamy, A.I., Elgorban, A.M. Hassan, E.M., Zaghloul, N.S., Alamery, S.F., El Gendy, A.E., Elhindi, K.M., El-Amier, Y.A. (2022). Essential Oil of *Ipomoea carnea*: Chemical Profile, Chemometric Analysis, Free Radical Scavenging, and Antibacterial Activities. *Sustainability*, 14: 9504. <https://doi.org/10.3390/su14159504>

AEMPS, 2018. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Guía sobre aceites esenciales en productos cosméticos. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Recuperado de https://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/docs/Guia_Aceites_Esenciales.pdf

Agudelo, C., Acevedo, S., Carrillo-Hormaza, L., Galeano, E., & Osorio, E. (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(7): 2068. Recuperado de <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/7/2068>

Antolinez Sandoval, E. Y., Almanza Merchán, P. J., Baraona Rodriguez, A. F., Polanco Díaz, E., & Serrano Cely, P. A. (2020). Estado actual de la cacaocultura: una revisión de sus principales limitantes. *Ciencia y Agricultura*, 17(2): 1–11. <https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n2.2020.10729>.

Arbeláez, L. (2010). Análisis de la diversidad intraespecie de *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* Por medio de marcadores morfológicos y genéticos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 133 p. Recuperado de https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/3431?locale-attribute=pt_BR

Arvelo Sánchez, M. Á., Gonzáles León, D., Delgado López, T., Maroto Arce, S., & Montoya Rodríguez, P. (2017). Estado actual sobre la producción, el comercio y cultivo del cacao en América. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura*, 283 p. Recuperado de <https://repositorio.iica.int/handle/11324/2793>.

Arvelo Sánchez, M. A., Gonzáles León, D., Moroto Arce, S., Delgado López, T., & Montoya López, P. (2017). *Manual Técnico del Cultivo de Cacao Prácticas Latinoamericanas*. Instituto interamericano de coperación para la agricultura. Recuperado de <https://repositorio.iica.int/handle/11324/6181>

Bailey, B. A., & Meinhardt, L. W. (2016). Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters. In *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New*

Encounters. Springer Nature. ISBN : 978-3-319-24787-8 <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>

Bhandari, G., Dhasmana, A., Chaudhary, P., Gupta, S., Gangola, S., Gupta, A., Rustagi, S., Shende, S. S., Rajput, V. D., Minkina, T., Malik, S., & Slama, P. (2023). A Perspective Review on Green Nanotechnology in Agro-Ecosystems: Opportunities for Sustainable Agricultural Practices & Environmental Remediation. *Agriculture*, 13(3): 668. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030668>

Barbosa, C. S., Fonseca, R. R., Batista, T. M., Barreto, M. A., Argolo, C. S., Carvalho, M. R. De, Oliveira, D., Mário, E., Silva, D. A., Arévalo-gardini, E., Hidalgo, K. S., Franco, G. R., Pirovani, C. P., Micheli, F., & Gramacho, K. P. (2018). Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations. *BMC Genomics*, 19(509): 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12864-018-4875-7>.

Barsottini, M. R. O., Copsey, A., Young, L., Baroni, R. M., Cordeiro, A. T., Pereira, G. A. G., & Moore, A. L. (2020). Biochemical characterization and inhibition of the alternative oxidase enzyme from the fungal phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020->

Cárdenas, N., Darghan, A., Sosa, M., & Rodriguez, A. (2017). Análisis espacial de la incidencia de enfermedades e diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L .) en el Yopal (Casanare), Colombia. Spatial Analysis of Diseases Incidence in Different Cocoa Genotypes (*Theobroma cacao* L .) in Yopal (Casanare),. *Acta Biológica Colombiana*, 22(2): 209–220. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.-v22n2.61161>

Cilas, C., & Bastide, P. (2020). Challenges to Cocoa Production in the Face of Climate Change and the Spread of Pests and Diseases. *Agronomy*, 10(9): 1–8. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091232>.

Delgado-Ospina, J., Molina-Hernández, J. B., Chaves-López, C., Romanazzi, G., & Paparella, A. (2021). The role of fungi in the cocoa production chain and the challenge of climate change. *Journal of Fungi*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/jof7030202>.

De Souza, P. A., Moreira, L. F., Sarmiento, D. H. A., & da Costa, F. B. (2018). Cacao—*Theobroma cacao*. *Exotic Fruits*, 3: 69–76. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00010-1>

DGPA. (2021). Observatorio de Commodities: Cacao. In *Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego*. Dirección general de políticas agrarias. Ministerio de desarrollo agrario y riego. Lima, Perú. Recuperado de <http://repositorio.midagri.gob.pe:80/js-pui/handle/20.500.13036/1170>

FAO. (2020). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: El encanto del chocolate de origen ecuatoriano | FAO en Ecuador | Food and Agriculture Organization of the United Nations*. El encanto del chocolate de origen ecuatoriano. Recuperado de <http://www.fao.org/ecuador/noticias/detail-events/en/c/1295417/>

FEDECACAO. (2017). *Caracterización de materiales registrados por FEDECACAO*. Grupo de Investigación e Innovación en Cacao. Federación Nacional de Cacaoteros. Recuperado de https://drive.google.com/file/d/1hBwOZVbRy-QEw_WT_IJP09HEmvQLydxNj/view

FEDECACAO. (2021). *En tiempos de pandemia, producción de cacao alcanzó cifra récord*. En *Tiempos de Pandemia, Producción de Cacao Alcanzó Cifra Récord*. Recuperado de <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-04-23-20-00-33/1381-en-tiempos-de-pandemia-produccion-de-cacao-alcanzo-cifra-record>

FEDECACAO. (2022a). La producción cacaotera nacional sigue creciendo: en 2021 logra un nuevo récord histórico. Federación nacional de Cacaoteros. In *11 de Febrero*. Recuperado de <https://www.fedecacao.com.co/post/la-produccion-cacaotera-nacional-sigue-creciendo-en-2021-logra-un-nuevo-record-historico>

FEDECACAO. (2022b). Producción nacional en toneladas en el 2021. Federación nacional de Cacaoteros. Recuperado de <https://www.fedecacao.com.co/economia-nacional>

Ferraz, P., Cássio, F., Lucas, C. (2019). Potential of yeast as biocontrol agents of the phytopathogen causing cacao withche's broom disease: is microbial warfare a solution? *Frontiers in Microbiology*, 10: 1766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01766>

Flores, V., Gómez Rodríguez, L., López García, J. A., & Grajales Conesa, J. (2022). Mecanismos de infección endógena en frutos de cacao con *Moniliophthora roreri*. *Polibotánica*, 0(53): 197–209. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.53.13>.

Gayi, S. K., & Tsowou, K. (2016). Cocoa industry: Integrating small farmers into the global value chain Cocoa industry : Integrating small farmers into the global value chain. *United Nations Conference on Trade and Development*, 7: 49. Recuperado de https://unctad.org/system/files/official-document/suc2015d4_en.pdf

Gómez-López A, Martínez-Bolaños L, Ortiz-Gil G, Martínez-Bolaños, M., Avendaño-Arrazate, C.H., Hernández-Meneses, E. (2020). Bioaceites esenciales inhiben a *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.*, causante de la moniliasis en el cultivo del cacao. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 6(1): E0061016. Recuperado de <http://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/130>

He, D. C., He, M. H., Amalin, D. M., Liu, W., Alwindia, D. G., & Zhan, J. (2021). Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogens*, 10 (10): 1311. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101311>

ICCO. (n.d.). *Cultivo de cacao. Origins Of Cocoa And Its Spread Around The World Organización Internacional del Cacao*. Recuperado de <https://www.icco.org/growing-cocoa>

ICCO. (2022a). *Fine or Flavor Cocoa - International Cocoa Organization*. Recuperado de <https://www.icco.org/fine-or-flavor-cocoa/>

ICCO. (2022b). *Quarterly Bulletin of Cocoa Production QBCJS-XLVIII-No.-1 International Cocoa Organization*. Recuperado de <https://www.icco.org/november-2022-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics/>

Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53:101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>

Khan, S. A. (2020). Metal nanoparticles toxicity : role of physicochemical aspects. In *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications*. Chapter 1. pp. 1–11). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816960-5.00001-X>

Konappa, N., Krishnamurthy, S., Arakere, U.C., Chowdappa, S., Akbarbasha, R., Ramachandrappa, N.S. (2021). Chapter 12 - Nanofertilizers and nanopesticides: Recent trends, future prospects in agriculture, *In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Advances in Nano-Fertilizers and Nano-Pesticides in Agriculture, Woodhead Publishing*, Pages 281-330. ISBN 9780128200926. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820092-6.00012-4>.

Larbi-Koranteng, S., Awuah, R.T., Kankam, F. (2020). Biological control of black pod disease of cocoa (*Theobroma cacao L.*) with *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.* *in vitro* and *in the field*. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 12(2): 52-63. Recuperado de <https://academicjournals.org/journal/JMA/article-full-text-pdf/8C724B764743>

Lisboa, D. O., Evans, H. C., Araújo, J. P. M., Elias, S. G., & Barreto, R. W. (2020). *Moniliophthora perniciosa*, the mushroom causing witches' broom disease of cacao: Insights into its taxonomy, ecology and host range in Brazil. *Fungal Biology*, 124(12): 983–1003. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.09.001>

Lorena, D., Javier, J., & Sandra, C. A. (2022). Frosty pod rot : a major threat to cacao plantations on the move. *Tropical Plant Pathology*, 187–200. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00472-y>

- Másmela-Mendoza, J. E. (2019). Potential distribution and fundamental niche of *Moniliophthora* spp in cocoa of America and Africa. *Agronomy Mesoamerican*, 30(3), 659–679. <https://doi.org/10.15517/am.v30i3.35038>
- Mejía, L.C., Rojas, E., Van Bael, S.A., Maynard, Z. (2021). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1): 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>
- Miljaković, D., Marinković, J., Balešević-Tubić, S. (2020). The Significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, 8:1037. DOI: 10.3390/microorganisms8071037
- Nazzaro, F., Fratianni, R. Coppola, V. Feo. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* (Basel) ,10(4):86. doi: 10.3390/ph10040086
- Neme, K., Nafady, A., Uddin, S., & Tola, Y. B. (2021). Application of nanotechnology in agriculture, postharvest loss reduction and food processing: food security implication and challenges. *Heliyon*, 7(12): e08539 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08539>
- Nembot, C., Takam, P., Ambang, Z., ten Hoopen, G. ., & Dumont, Y. (2017). On the use of Mathematical Modelling to study the impact of phytosanitation on cocoa black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *ISCR, June 2018*. Recuperado de <https://agritrop.cirad.fr/588134/>
- Osorio-Guarín, J. A., Berdugo-Cely, J., Coronado, R. A., Zapata, Y. P., Quintero, C., Gallego-Sánchez, G., & Yockteng, R. (2017). Colombia a source of cacao genetic diversity as revealed by the population structure analysis of germplasm bank of *theobroma cacao* l. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01994>
- Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S., & Esquivel, K. (2020). Nanoparticles in agroindustry: Applications, toxicity, challenges, and trends. *Nanomaterials*. 10(9): 1–33. doi: 10.3390/nano10091654
- Parrish, N., Fisher, S.L., Gartling, A., Craig, D., Boire, N., Khuvis, J., Riedel S., Zhang, S. (2020). Activity of various essential oils against clinical dermatophytes of *Mycrosporium* and *Trychophyton*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10:545913. doi: 10.3389/fcimb.2020.545913
- Pereira, S., Reis, M., Santana, V., Georgia, N., Patrocínio, R. B., Rocha, G., Solis, K., Pe, S., Julia, M., Teixeira, G. A., Ar, E., & Gramacho, K. P. (2022). A molecular diagnostic for *Moniliophthora perniciosa* , the causal agent of witches ' broom disease of cacao, that differentiates it from its sister taxon *Moniliophthora roreri*. *Crop Protection*, 158: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106003>.

- Pérez-Vicente, L. (2018). *Moniliophthora roreri* H.C. Evans *et al.* y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(1): 00–00. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S101027522018000100007&lng=es&nrm=iso
- Perrine-Walker, F. (2020). *Phytophthora palmivora*–cocoa interaction. *Journal of Fungi*, 6(3): 1–20. <https://doi.org/10.3390/jof6030167>
- Pieterse, C., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52:347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Rani, M., Tyagi, K., & Jha, G. (2020). Advancements in plant disease control strategies. In *Advancement in Crop Improvement Techniques*, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818581-0.00010-3>
- Rasool, F., Singh, P., Anwar, A., & Mughal, N. (2022). *Disease management approaches-strategies and concepts*. *The Pharma Innovation Journal*, 11(7): 413–417. Recuperado de <https://www.thepharmajournal.com/archives/2022-vol11issue7S/PartF/S-11-6-58-833.pdf>
- Reyes Sanabria, N. A. (2019). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos del género Piper contra *Moniliophthora perniciosa*, agente causal de escoba de bruja en cacao. Universidad Javeriana. Tesis de pregrado. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/43262>
- Rodriguez-Medina, C., Arana, A. C., Sounigo, O., Argout, X., Alvarado, G. A., & Yockteng, R. (2019). Cacao breeding in Colombia, past, present and future. *Breeding Science*, 69(3): 373–382. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19011>
- Romero Hernández, E. (2016). *Evaluación ecomorfológica de cacao (Theobroma cacao L.) sometido a distintas campus xalapa fertilizaciones, en la comunidad de nuevo Ojital, municipio de Papantla*, ver. [Universidad Veracruzana]. <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/47417>
- Rozo Ortega, G. P. (2019). *Cambios en la calidad comercial e industrial del trigo pan (Triticum aestivum L.) asociados a enfermedades biotróficas y necrotroficas*. Universidad de Buenos Aires. Tesis doctoral. Disponible en: https://www.lareferencia.info/vufind/Record/AR_c8e12e281020fb888cda0a19ff3bedbd
- Sajid, M., & Płotka-Wasyłka, J. (2020) Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. *Microchemical Journal*, 154: 104623. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104623>

Salas Tornés, J., & Hernández Sánchez, L. Y. (2015). Cacao, una aportación de México al mundo. *Ciencia*, 8: 33-39. <https://doi.org/10.4271/2013-01-1047>

Salazar, B. M., Besas, U. P., Cosico, V. L. N., Valencia, A. M., & Salazar, B. T. (2019). Trinitario cacao (*Theobroma cacao L.*) trees exhibited better yields with Fertigro R nanofertilizers. *Philippine Journal of Crop Science (Philippines)*, 44 (1). ISSN 0115-463X Recuperado de <https://agris.fao.org/search/en/records/647473aabf943c8c798316bd>

Saleh, T. A. Environmental Technology & Innovation Nanomaterials : Classification, properties, and environmental toxicities. (2022). *Environmental Technology & Innovation*, 20: 101067. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>

Salem, S. S., & Fouda, A.(2021). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biological Trace Element Research*, 199(1): 344–370. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>

Sánchez González, L., Vargas, M., Gonzalez-Martinez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2011). Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews*, 3:1-16. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9031-3>

Sharma, S., Barkauskaite, S., Swarna, J. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 343: 128403. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128403

Singh, V. K., Singh, R., Kumar, A., & Bhadouria, R. (2021). Current status of plant diseases and food security. *Food Security and Plant Disease Management*, Chapter 2: pp 19–35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821843-3.00019-2>

Solis, K., Peñaherra, S., & Vera, D. (2021). Las enfermedades del cacao y las buenas prácticas agronómicas para su manejo. *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias*. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec › iniapbee-tpG178>.

Stratakos, A.C & Koidis, A. (2016). Methods for Extracting Essential Oils. In: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Academic Press, Cambridge. 31-38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>

Syamsuddin, M., Chamzurni, T., Maulidia, V. (2021). Indigenous Rhizobacteria treatment in controlling diseases *Phytophthora palmivora* and increasing the viability and growth of cocoa seedling. *Natural Journal*, 21 (2):105-113. DOI: 10.24815/jn.v21i2.21216

Tirado-Gallego, P. A., Lopera-Álvarez, A., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao L.*: Revisión sistemática. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*,

17(3), 417–430. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:517.

Tocafundo, F., Souza, G. De, Elisângela, R., Antônio, C., & Melo, F. De. (2021). Direct and cross - pathogenicity of *Phytophthora palmivora* against cacao , papaya , and peach palm. *Tropical Plant Pathology*, 664–673. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00464-y>

Ul Haq, I., Ijaz, S., & Khan, N. A. (2020). Application of Nanotechnology for Integrated Plant Disease Management. In I. Ul Haq & S. Ijaz (Eds.), *Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches*, pp. 173–185. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3_8

Villamizar-Gallardo, R., Cruz, J. F. O., & Ortíz, O. O. (2016). Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 51(12): 1929–1936. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016001200003>

Villamizar-Gallardo, R. A., Ortíz-Rodríguez, O. O., & Escobar, J. W. (2017). Symbiotic and endophytic fungi as biocontrols against cocoa (*Theobroma cacao L.*) phytopathogens. *Summa Phytopathologica*, 43(2): 87–93. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2175>

Waage, J.K., Greathead, D.J. (1988). Biological control: Challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 318:111–128. <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0001>

Xu, L., Wang, Y. Y., Huang, J., Chen, C. Y., Wang, Z. X., & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, 10(20): 8996–9031. DOI: 10.5772/intechopen.99367

Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I., Fouet, O., Argout, X., Guichoux, E., Salin, F., Solorzano, R. L., Bouchez, O., Vignes, H., Severts, P., Hurtado, J., Yopez, A., Grivetti, L., Blake, M., & Valdez, F. (2018). The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology and Evolution*, 2(12): 1879–1888. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0697-x>

Zhang-X; Niu -H; Yan-J; Cai Y. (2011). Immobilizing silver nanoparticles on to the surface of magnetic silica composite prepare magnetic disinfectant with enhanced stability and antibacterial activity. *Colloids and surface. A*, 375:186–192. DOI:10.1016/j.colsurfa.2010.12.009



CAPÍTULO II

Determinación *in situ* de la incidencia puntual de moniliasis y mazorca negra en algunas fincas cacaoteras del departamento de N. de S., Colombia



CAPÍTULO II

Determinación *in situ* de la incidencia puntual de moniliaisis y mazorca negra en algunas fincas cacaoteras del departamento de N. de S., Colombia

Raquel Amanda Villamizar Gallardo

Grupo de Investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible, Universidad de Pamplona, campus Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. raqvillamizar@unipamplona.edu.co

1. Introducción

La producción de cacao en el país se ve afectada por muchas variables dentro de las que se destacan la avanzada edad de las plantaciones sembradas, el tipo de material de propagación utilizado y las dificultades que encuentra el agricultor para poner en práctica las recomendaciones de manejo integral del cultivo, lo cual se ve influenciado en ocasiones por la ubicación de las plantaciones en zonas de difícil acceso. Lo anterior, sumado a la falta de transferencia de nuevas tecnologías, hacen que el manejo del cultivo no sea el más óptimo en varias regiones del país.

La baja distribución de materiales biológicos resistentes o tolerantes a plagas aunado al cambio climático que afrontamos en la actualidad, aumenta el riesgo de infestación por microorganismos fitopatógenos. Investigadores alrededor del mundo han reportado la moniliasis cuyo agente etiológico

es el hongo *Moniliophthora roreri* (Cárdenas *et al.*, 2017) y la mazorca negra causada por el pseudo-hongo *Phytophthora* sp (Cedeño *et al.*, 2020), como dos de las enfermedades que mayor impacto genera en la productividad de cacao. En el primer caso, la enfermedad es endémica de este cultivo, mientras que la segunda, tiene un amplio espectro de acción sobre gran variedad de plantas (ICCO, 2021). Algunas condiciones fitosanitarias relacionadas con la zona agroecológica, la severidad del inóculo y el manejo inadecuado del cultivo, permiten una afectación significativa de los cultivos (Jaimes y Aranzazu, 2010).

La moniliasis en Colombia ha impactado usualmente el 40% de la producción anual de cacao y es considerada una enfermedad endémica en todos los departamentos donde se produce. No obstante, estudios realizados entre 2005 y 2006 en varias fincas ubicadas alrededor de la geografía nacional, reportaron entre otros datos que el más alto porcentaje de incidencia de la enfermedad se presentaba en el departamento Norte de Santander (N de S) con un 84,1% (Cubillos *et al.*, 2019). En 2019, Villamizar y colaboradores, reportaron la incidencia puntual de moniliasis y mazorca negra en 4 zonas del departamento N de S, con rangos que oscilaron entre 0.37% hasta 21.58% y desde 1.75 % hasta 35.59 %, respectivamente. Los investigadores lograron identificar 15 morfoespecies, 9 de ellas correspondientes a *Moniliophthora roreri* y 6 a *Phytophthora palmivora*. Además, reportaron la susceptibilidad de los materiales biológicos de tipo híbrido comparado con la tolerancia exhibida por algunos clones que estudiaron (Villamizar *et al.*, 2019).

En este capítulo se da continuidad al trabajo investigativo iniciado en 2019, evaluando dos fincas más pertenecientes a la Federación Nacional de Cacaoteros, ubicadas en el municipio de San Cayetano en el departamento Norte de Santander. El objetivo de la investigación fue seguir profundizando sobre la agro-ecología del cultivo en el departamento Norte de Santander para, de alguna manera, a mediano plazo aportar alternativas de manejo y control desde un enfoque Bio-Nano-tecnológico.

2. Metodología

2.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de frutos infestados con moniliasis y mazorca negra (Capítulo I, inciso 5) en 2 fincas ubicadas en el municipio de San Cayetano, N de S. Las fincas se seleccionaron bajo los siguientes criterios: pertenecer a la Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), que ofrecieran condiciones adecuadas de seguridad y asistencia en campo, con una media de 1 Ha sembrada y un rendimiento promedio de 2000 Kg/Ha/año en condiciones óptimas de manejo de cultivo; esto quiere decir manejo agro cultural y aplicación profiláctica de control químico Ridomil (mancozeb+metalaxyl) y oxiclورو de cobre. Se analizaron los clones ICS 95 y CCN51. Las mazorcas fueron embaladas en papel plástico, rotuladas y transportadas en cavas provistas de hielo seco hasta el laboratorio para su respectivo procesamiento.

2.2. Determinación *in situ* de la incidencia puntual de moniliasis y mazorca negra

El cálculo del porcentaje de incidencia puntual (%IP) en campo de moniliasis y mazorca negra, se llevó a cabo tomando el 10% de la población total sembrada en una hectárea de cultivo de cacao y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%IP = \frac{\text{Número de } M_E \text{ en el 10\% de la población}}{(\text{Número de } M \text{ en el 10\% de la población} + \text{número de } M_E \text{ en el 10\% de la población})} \%100$$

Donde,

%IP= Porcentaje de incidencia puntual.

M= Mazorcas sanas.

Me= Mazorcas enfermas (*por Phytophthora sp o Moniliophthora roreri*)

2.3. Aislamiento de los agentes etiológicos

2.3.1. Preparación de medios de cultivo

Los aislamientos fúngicos se realizaron en agar V8, agar avena y agar malta modificado con extracto de cacao obtenido a partir de mazorcas sanas. Para la obtención del extracto de cacao se pesaron 0,1 g del macerado de cacota y se suspendieron en 10 mL de agua destilada. Posteriormente, se calentó la suspensión a 60 °C durante 1 h. El extracto se filtró usando filtro Whatman No. 1 y después se centrifugó a 4000 rpm. Seguidamente se adicionó al 1% al agar malta posterior a la esterilización del medio.

2.3.2. Obtención de cultivos axénico

El aislamiento de los patógenos se realizó de forma indirecta y directa. En el primer caso, se emplearon mazorcas con lesiones características, las cuales fueron lavadas con hipoclorito de sodio al 5% y agua destilada estéril, con la finalidad de eliminar la carga bacteriana y fúngica presente a nivel de la corteza. Seguidamente, se retiró la corteza superior y se seleccionaron trozos de 0,5 cm que se inocularon sobre los respectivos medios de cultivo (Figura 1). El aislamiento directo se realizó tomando el inóculo por punción con asa recta, a partir de mazorcas enfermas (Figura 2). Posteriormente, se incubaron (incubadora MEMMERT) a 25°C/ 8 a 10 días. A partir del crecimiento mixto, se realizaron repiques hasta obtener cultivos axénicos (Santos, 2013), los cuales fueron mantenidos en agar malta (OXOID) modificado con extracto de cacao (1%). Además, se adicionó cloranfenicol como inhibidor de biota competente. Para favorecer la formación de estructuras reproductivas necesarias para la caracterización microscópica, los hongos fitopatógenos fueron sembrados en agar arveja (10 g/L) e incubados a 25°C /18 días.

Figura 1

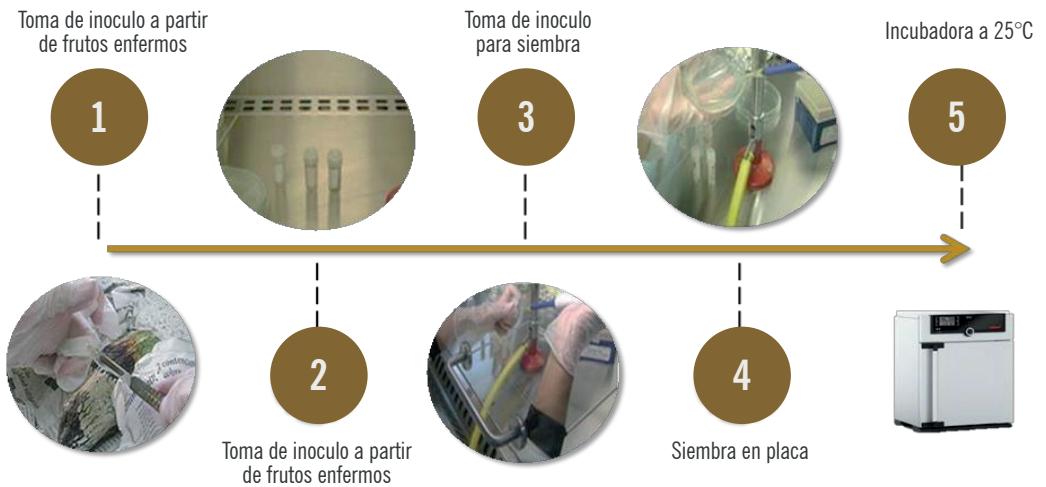
Aislamiento indirecto de hongos fitopatógenos a partir de cacotas enfermas



Fuente: Equipo investigador

Figura 2

Aislamiento directo de hongos fitopatógenos a partir de cacotas enfermas



Fuente: Equipo investigador

2.3.3. Caracterización morfológica

La caracterización macroscópica se realizó teniendo en cuenta aspectos tales como: textura, borde, presencia o ausencia de anillos, color de micelio descritas por (Phillips-Mora *et al.*, 2006), con algunas modificaciones (Alexopoulos 1979., Arbeláez, 2010). El color del micelio se determinó de acuerdo con la tabla de colores de Munsell, 1991. La forma y tamaño de esporas se determinó a los 18 días de incubación, tiempo en el cual se logró identificar con mayor claridad las estructuras reproductivas de los fitopatógenos de interés. Para tal fin, se empleó azul de lactofenol como agente de contraste y se observó en objetivo de 40 X (microscopio Olympus). Las fotografías se tomaron con cámara digital y posteriormente fueron procesadas empleando el programa Image J (acceso gratuito <https://imagej.net/ij/>), en el cual se midieron el largo y el ancho de varias esporas al azar.

3. Resultados

En la tabla 1 se muestran los resultados del cálculo de incidencia puntual de moniliasis y mazorca negra en dos fincas ubicadas en el municipio de San Cayetano en el Departamento de Norte de Santander junto a las condiciones agroecológicas de la zona evaluada. Se determinaron bajos niveles de las dos enfermedades a una altitud de 350 msnm y temperaturas promedio de 28°C.

Tabla 1

Relación de fincas (F), materiales biológicos evaluados, condiciones agroecológicas y porcentajes de incidencia puntual M: moniliasis MN: mazorca negra

Departamento Norte de Santander	Material Biológico (T. Cacao L)	T (°C) promedio	HR promedio (%)	Altura promedio (MSNM)	Ha Cultivadas	%IP M	%I MN
Municipios: San Cayetano corregimiento/ vereda: Cornejo; la Amarilla.	ICS 95 Finca: F1	28	70	350	1 Ha	0,74	0,74
	CCN 51 Finca: F2				1 Ha	0,18	0,31

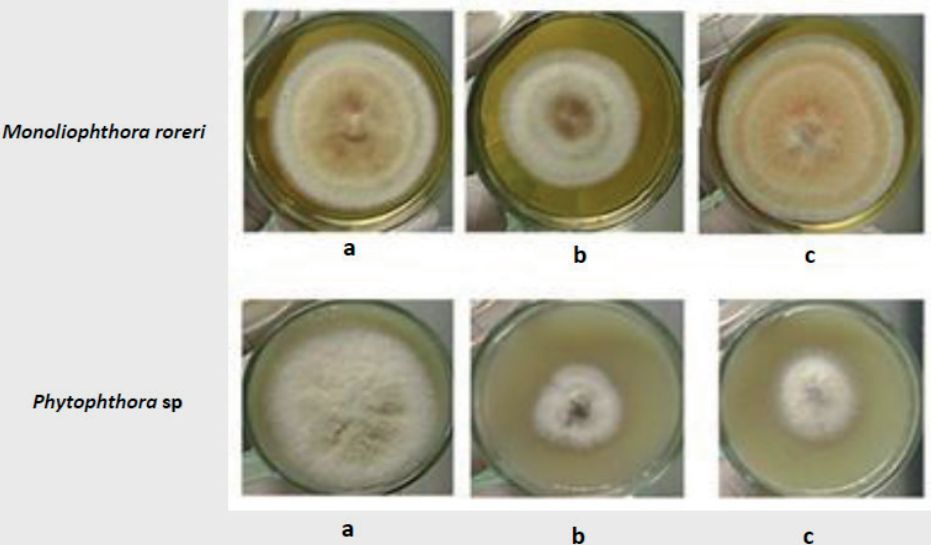
Fuente: Equipo investigador

Los porcentajes de incidencia puntual calculada *in situ* oscilaron en el rango de 0,18% - 0.74 % y de 0,31 a 0.74 % para moniliasis y mazorca negra, respectivamente. En términos generales se encontró que los materiales biológicos sembrados en las dos fincas evaluadas, a saber, ICS 95 y CCN 51, exhibieron tolerancia a las dos enfermedades estudiadas.

A nivel macroscópico se obtuvo que los dos fitopatógenos presentaron textura afelpada, estriada o algodonosa, siendo más predominante para *Moniliophthora roreri* la textura afelpada. Adicionalmente, una característica de este fitopatógeno fue la formación de anillos centrales y/o terminales, lo cual puede apreciarse en la figura 3-superior, numerales a, b y c. En el caso de *Phytophthora* sp, se encontró que este fitopatógeno exhibió esporulación uniforme sobre el medio de cultivo con bordes bien definidos, sin formación de anillos. La coloración del micelio fue variable en la escala de amarillento a beige (figura 3-inferior, numerales a, b y c).

Figura 3
Moniliophthora roreri y *Phytophthora palmivora* en a) Agar Malta modificado con extracto de cacao b) Agar V8 c) Agar arveja aisladas a partir de cultivos en algunas fincas cacaoteras del departamento Norte de Santander, Colombia

Características morfológicas

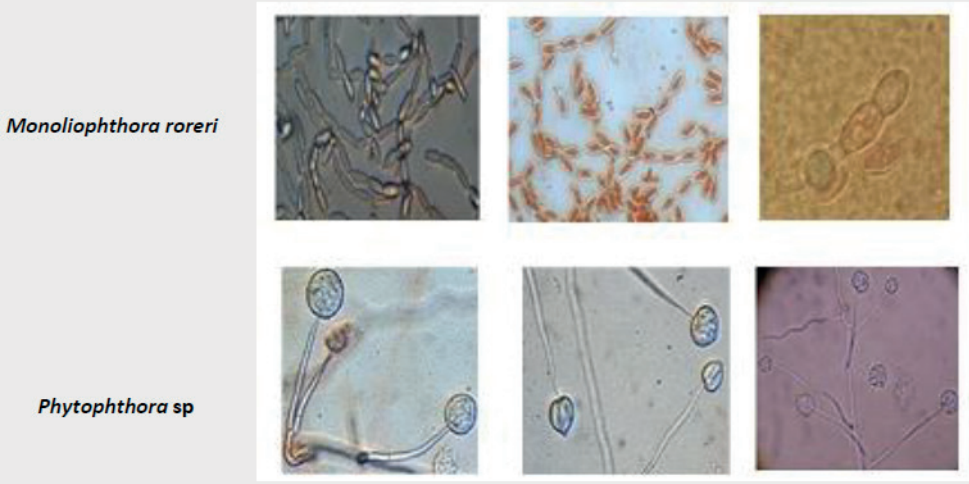


Fuente: Equipo investigador

A nivel microscópico las cepas de *M. roleri* evidenciaron la formación de esporas en cadena e hifas septadas. Con respecto a la forma y el tipo de esporas, se encontraron globosas, ovoides o elipsoides con una relación largo/ancho para esporas individuales de aproximadamente 2 μm , presentándose en menor proporción esporas elipsoides. En contraste, *Phytophthora* sp. produjo esporangios papilados, conteniendo zoosporas en su interior, con una relación largo/ancho de aproximadamente 3 μm (Figura 4).

Figura 4
Estructuras reproductivas encontradas en los aislados Moniliophthora roleri y Phytophthora sp.

Características microscópicas



Nota. Se observan los zoosporangios conteniendo las zoosporas. *Fuente:* Equipo investigador

4. Discusión

A través de este estudio, se pudo determinar la presencia de moniliasis y mazorca negra en las 2 fincas evaluadas en el municipio de San Cayetano, departamento Norte de Santander. La incidencia puntual de las dos enfermedades fue ligeramente menor comparada los resultados reportados por Villamizar y colaboradores en 2019, para los mismos materiales biológicos

(Villamizar *et al.*, 2019). Esto podría en cierta forma atribuirse a la campaña de sensibilización que ha venido realizando FEDECACAO en los últimos años sobre la renovación y siembra de materiales biológicos clonales más tolerantes a las enfermedades. Con este hallazgo se confirma que, una amplia distribución de estos a las medianas y pequeñas fincas ubicadas a lo largo y ancho de la geografía del departamento, sumado a buenas prácticas agroecológicas asegurarían un aumento considerable en el ranking de producción departamental y nacional, ya que la región cuenta con las condiciones edafoclimáticas y calidad de suelo necesarias para la óptima producción de cacao (Villamizar, 2019).

Analizando el crecimiento macroscópico y las estructuras microscópicas (forma y tamaño de las esporas) se pudo determinar que los hongos aislados correspondían a las especies de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*. Esto coincide con los reportes hechos por Villamizar y colaboradores, quienes aislaron 9 cepas de *Moniliophthora roreri* y 6 de *Phytophthora palmivora* a partir de cultivos infestados con moniliasis y mazorca negra en 4 zonas del departamento Norte de Santander. La forma y tamaño de las estructuras reproductivas de los dos patógenos, coinciden con lo reportado por investigadores como Pérez-Vicente, quien estudió las estructuras morfológicas y crecimiento de las colonias de *M. roreri* en Ecuador, Venezuela y Costa Rica (Perez-Vicente, 2018) y los reportes de Rogríguez y Vera, quienes realizaron identificación de la pudrición parda de la mazorca de cacao a causa de *Phytophthora palmivora* (Cedeño *et al.*, 2020).

A nivel de laboratorio se pudo evidenciar que, la modificación de medios de cultivo empleando cacao (1%), favoreció el crecimiento de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*, a diferencia de medios sintéticos sin modificar, ya que proporcionan nutrientes autóctonos que promueven el crecimiento de los patógenos, facilitando así su identificación. Lo anterior coincide con lo reportado por (Santos 2013), quien demostró que medios modificados con cacao favorecen el crecimiento de especies de *Moniliophthora roreri*.

5. Conclusiones

La presente investigación permitió determinar *in situ*, la incidencia puntual de dos enfermedades de origen microbiano en cultivos de cacao establecidos en fincas pertenecientes al municipio San Cayetano, del departamento Norte de Santander, con porcentajes que oscilaron entre 0,18% - 0,74 % y de 0,31% - 0,74% para moniliasis y mazorca negra, respectivamente; demostrando que los dos materiales clonales analizados exhiben alta tolerancia. De igual manera, se pudo identificar que los agentes etiológicos implicados fueron *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*, de acuerdo a las características macroscópicas en medio de cultivo y microscópicas evaluadas. Estas dos cepas nuevas se suman a las 15 cepas aisladas previamente, en estudio realizado en 2019 y se conservarán en el stock de cepas del laboratorio NANOSOST de la Universidad de Pamplona, para fines investigativos posteriores. Se ampliará la investigación hacia la caracterización molecular de las morfo especies identificadas a fin de poder establecer, por ejemplo, relación filogenética entre ellas, entre otros aspectos, que puedan alimentar nuestro conocimiento sobre la agroecología del cultivo.

REFERENCIAS

Arbeláez, L. (2010). Análisis de la diversidad intraespecie de *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* Por medio de marcadores morfológicos y genéticos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 133 p. Recuperado de https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/3431?locale-attribute=pt_BR

Alexopoulos, C., Mims, C. (1979). *Introductory Micology*. 3rd. e i. New York, John Wiley. 632p.

Barrón, Y., Azpeitia, A., López, P., Mirafuentes, F. (2014). Metodología adaptada para la formación de híbridos F1 de cacao (*Theobroma cacao L.*) en Tabasco. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(5): 765-777. Recuperado de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000500004

Cárdenas, N., Darghan, A., Sosa, M., & Rodriguez, A. (2017). Análisis espacial de la incidencia de enfermedades e diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao L.*) en el Yopal (Casanare), Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 22(2): 209–220. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n2.61161>

Carvajal, J., Blanco, J., Viteri, S. (2012). Evaluación *in vitro* de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao L.*). *Revista de la Facultad de Agronomía Medellín*, 65(1): 6305-6315. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179924340002>

Cedeño, Á., Romero, R., Auhing, J., Mendoza, A., Abasolo, F., & Canchignia, H. (2020). Caracterización de *Phytophthora* sp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51 Characterization of *Phytophthora* sp. and application of rhizobacteria with biocontrol. *Scientia Agropecuaria*, 11(4): 503–512. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.05>

Cubillos, G., Quiroz, T., Hincapié-Echeverri, O. (2019). La moniliasis del cacao: daños, síntomas, epidemiología y manejo. ISBN digital: 978-958-52485-0-2. Recuperado de <https://www.agrosavia.co/media/11540/69317.pdf>

ICA. (2012). *Manejo Fitosanitario del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.)*. Medidas para la temporada invernal. 40p. Recuperado de [https://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/-](https://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/)

ICCO. (2021). *Pests & Diseases - International Cocoa Organization*. Recuperado de <https://www.icco.org/pests-diseases/#toggle-id-39>

Munsell, A.H. Soil Color Charts. Munsell Color. (1990). Macbeth Division of Kollmorgen 382 instruments Corporation. Baltimore, Maryland.

Pérez-Vicente, L. (2018). *Moniliophthora roreri* H.C. Evans *et al.* y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. *Revista de Protección Vegetal*. 13(1). ISSN 1010-2752 versión On-line ISSN 2224-4697. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522018000100007

Phillips-Mora, W.; Aime, M.C.; Wilkinson, M.J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical América. *Plant Pathology*, 349(56), 911-922. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01646.

Pérez-Vicente, L. (2018). *Moniliophthora roreri* H.C. Evans *et al.* y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(1), 00–00. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522018000100007

Santos, A., M. García, A.M. Cotes, Villamizar, L. (2013). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3):150-156. DOI: 10.1016/j.riam.2011.11.002

Suárez, L., Rangel, A. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de 388 *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica*, 62(4): 370-378. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v62n4/v62n4a11.pdf>

Villamizar-Gallardo, R., Osma, J. F., & Ortiz-Rodriguez, O. O. (2019). Regional evaluation of fungal pathogen incidence in colombian cocoa crops. *Agriculture*, 9(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/agriculture9030044>.

A detailed botanical illustration of a cacao branch with several large, veined leaves and two cacao pods. One pod is open, revealing a grid of seeds inside. The illustration is rendered in a fine-line, engraved style. The title 'CAPÍTULO III' is centered on the page, with the letter 'I' in the second 'P' of 'CAPÍTULO' partially obscured by a dark olive-green circle. The subtitle is positioned below the title, and the background features a faint, repeating pattern of the cacao branch illustration.

CAPÍTULO III

**Control biológico de patógenos primarios
y secundarios del cacao usando
Trichoderma viride y *Botryosphaeria
quercum*, todos autóctonos aislados de
cultivos en Norte de Santander**



CAPÍTULO III

Control biológico de patógenos primarios y secundarios del cacao usando *Trichoderma viride* y *Botryosphaeria quercum*, todos autóctonos aislados de cultivos en Norte de Santander

Raquel Amanda Villamizar Gallardo

Grupo de Investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible, Universidad de Pamplona, campus Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. raqvillamizar@unipamplona.edu.co

1. Introducción

Las enfermedades en plantas ocasionadas por microorganismos patógenos, representan un serio problema para los ecosistemas naturales, que se ven impactados con daños que ocasionan pérdidas anuales estimadas en 40 billones de dólares y altas repercusiones en la economía global (Syed Ab Rahman *et al.*, 2018). En el caso específico de enfermedades causadas por hongos, estas representan un 64-67 % del total que afecta a los cultivos a nivel global, con pérdidas del 20% a nivel de producción y más del 10 % en post-cosecha. Investigadores señalan que las enfermedades fúngicas se expanden a una velocidad de 8 Km/año y su acción se ve aumentada entre otros aspectos, por los extensos monocultivos establecidos alrededor del mundo (Fisher *et al.*, 2012, Fisher *et al.*, 2018).

A lo largo de la historia de la agricultura, se han desarrollado diferentes métodos de manera empírica por los propios cultivadores y de manera más científica por investigadores alrededor del mundo, para evitar el establecimiento y transmisión de patógenos. En función del tipo de cultivo, tipo de patógeno, localización geográfica, disponibilidad tecnológica, políticas regulatorias, entre otros factores, los controles pueden ser agro-culturales (poda y diversificación del cultivo), genéticos (manipulación de la tolerancia y/o resistencia), físicos (solarización, riego), químicos (uso de pesticidas e inductores de inmunidad del huésped) o biológicos (uso de microorganismos biocontroladores). Estos métodos pueden ser empleados de manera individual o en combinación, lo que se traduce en un manejo integrado del cultivo (MIC) (ICA, 2012).

En la literatura existen reportes de un grupo de hongos que tienen efecto antagonico frente a fitopatógenos, que pueden ser empleados como controladores de tipo biológico. De acuerdo al modo de acción, los BACs (de su sigla en inglés Biocontrol Agents) pueden clasificarse entre otros, como supresores de patógenos, comportándose como hiperparásitos que emplean la antibiosis para matar directamente al patógeno o para dejarlo sin energía y por tanto metabólicamente inactivo. Otros compiten por nicho y nutrientes liberando compuestos antimicrobianos (Hou *et al.*, 2020).

Investigadores de sistemas agroforestales de cacao en Tabasco, México, han identificado morfológica y molecularmente nueve aislados de *Trichoderma asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum*/*H. lixii*, *T. koningiopsis*/*H. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*/*H. sagamiensis*, *T. pleuroticola*, *T. reesei*/*H. jecorina*, *T. spirale* y *T. virens*/*H. virens* con potencial antagonico contra monilia (Torres *et al*, 2015). Uno de los productos comercializados a gran escala para controlar enfermedades del cacao ha sido el Tricovab (*T. stromaticum*) (Hermosa *et al*, 2013). Los mecanismos de acción antagonica de *Trichoderma* se describen como competencia, antibiosis y micoparasitismo (López-Ferrer *et al*, 2017).

A nivel nacional, en Santo Domingo, Antioquia, investigadores aplicaron por aspersión un lixiviado combinado con el hongo *Trichoderma* sp. y lo compararon con un tratamiento de síntesis química. Los investigadores no reportaron diferencias significativas en las fracciones de mazorca sanas y el rendimiento, después de la aplicación de los dos tratamientos. No obstante, concluyeron que el control con *Trichoderma* era más eficiente con respecto al químico, convirtiéndolo en una alternativa de bajo costo para plantaciones de pequeña escala (Rojas *et al.*, 2016).

Según (Hawksworth y Lucking, 2017) la diversidad fúngica se estima, oscila entre 1,5 y 3,8 millones de especies donde los hongos endófitos son hospederos de aproximadamente 300.000 especies de plantas. El mecanismo de acción de un hongo endófito a diferencia de un antagonista, se basa en su capacidad para potenciar el desarrollo vegetal produciendo altas tasas de germinación, mayor biomasa en los tejidos y, por tanto, incrementando la resistencia a enfermedades causadas por otros microorganismos (Chaitra *et al.*, 2020).

Apreciando el potencial del control biológico como mecanismo natural para combatir enfermedades en el cacao, Villamizar y colaboradores reportaron el uso de hongos antagonistas y endofíticos aislados en tres departamentos de Colombia, con capacidad biocontroladora del crecimiento de hongos fitopatógenos primarios del cacao como *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora* y hongos fitopatógenos secundarios como *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani*. Los investigadores obtuvieron porcentajes de biocontrol cercanos al 80 %, afirmando que el efecto biocontrolador fue mayor en cepas obtenidas y aplicadas en un mismo nicho ecológico (Villamizar *et al.*, 2017).

En este capítulo se continúa con la investigación mencionada anteriormente, con el fin de evaluar el uso potencial de los biocontroladores *Trichoderma viride* y *Botryosphaeria quercum*, esta vez, directamente sobre corteza y pulpa de cacao contaminados artificialmente con el patógeno primario *Moniliophthora roreri*, y los secundarios *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani*.

2. Metodología

2.1. Preparación de stocks microorganismos patógenos

Las cepas de *Moniliophthora roreri*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* fueron aquellas aisladas y caracterizadas por Villamizar y colaboradores (Villamizar *et al.*, 2017, Villamizar *et al.*, 2019) y provistas por el laboratorio NANOSOST de la Universidad de Pamplona. Para obtener los inóculos de cada microorganismo, se adaptó la metodología propuesta por Santos M y colaboradores. Se partió de cultivos jóvenes (10 días), los cuales fueron depositados en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de solución salina 0,85 % con ayuda de un asa micológica. El contenido se agitó vigorosamente aplicando vortex a máxima revolución durante 120 segundos. Seguidamente, se realizaron diluciones en base 10 y se procedió a realizar el conteo de esporas empleando la cámara de Neubauer, visualizando a través de microscopio óptico (Olympus), objetivo 40 X. El número de esporas fue calculado mediante la fórmula mostrada abajo. El inóculo fue ajustado hasta obtener una concentración final entre $3 \cdot 10^6$ esporas/mL de cada uno de los patógenos analizados (Santos M, 2021).

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = \frac{\text{Recuento obtenido}}{\text{Número de cuadros contados}} \cdot \text{factor de dilución} \cdot \text{factor de la cámara}$$

2.2. Hongos biocontroladores

Se emplearon las cepas de *Trichoderma viride* y *Botryosphaeria quercum*, aislados a partir de muestras de suelo y mazorcas sanas de cultivos de cacao en Norte de Santander, caracterizados morfológica y molecularmente como lo reporta Villamizar y colaboradores (Villamizar *et al.*, 2017). La concentración de esporas de los hongos biocontroladores fueron ajustadas a la misma de los patógenos, $3 \cdot 10^6$ esporas/mL.

2.3. Ensayo de inhibición con hongos antagonistas en planta

Se realizó directamente sobre pulpa y corteza de cacao. Para ello se utilizaron placas estériles de 24 pocillos con tapa TC (Cellstar, Sigma Aldrich, EE.UU.) en las cuales se colocaron piezas de 0.125 cm³ de pulpa y corteza de cacao, respectivamente, previamente esterilizados bajo tratamiento con calor húmedo (121°C/15 lb de presión / 20 min). A cada trozo se le adicionaron 100 µL de cada uno de los biocontroladores hasta cubrir completamente y posteriormente, se contaminaron artificialmente con las respectivas soluciones conteniendo los patógenos. Tres pozos se marcaron como control positivo, los cuales sólo contenían los trozos de cacota inoculados con el biocontrolador y tres más como control negativo, en los cuales no se realizó inoculación. Los seroclusters se incubaron a 25°C/8 días. El ensayo fue realizado por triplicado. Se evaluó cualitativamente la capacidad del biocontrolador, para reducir y/o inhibir completamente el crecimiento del patógeno en corteza y pulpa de cacao.

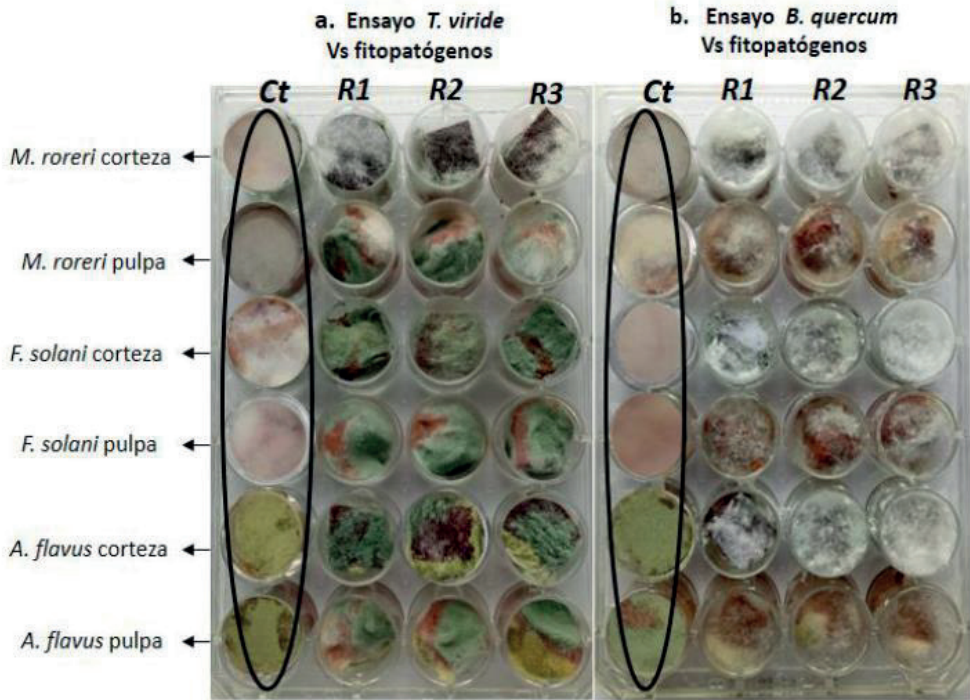
3. Resultados

El enfrentamiento del biocontrolador *T. viride* y del endófito *Botryosphaeria quercum* vs los patógenos del cacao *M. roreri*, *F. solani*, y *A. flavus* se muestra en la figura 1. Se puede observar que *T. viride* tuvo efecto ligeramente significativo sobre el crecimiento de *M. roreri* en pulpa, mientras que, en corteza el patógeno creció mucho más rápido y no permitió que el biocontrolador se expresara. En contraste, *T. viride* vs *F. solani* mostró un efecto inhibitorio, reduciendo al mínimo el crecimiento del patógeno tanto en corteza como en pulpa. En el ensayo *T. viride* vs *A. flavus*, se evidenció que tanto en pulpa como en corteza el biocontrolador y el patógeno crecieron en proporciones similares.

En el caso de *B. quercum* vs *M. roreri* se apreció crecimiento mayoritario del patógeno en corteza y ligero crecimiento en pulpa. *B. quercum* vs *F. solani* mostró efecto inhibitorio con crecimiento solo del biocontrolador tanto en corteza como en pulpa. Similar resultado se presentó con *A. flavus* en corteza, no obstante, en pulpa el patógeno creció ligeramente.

Figura 1

Ensayo de inhibición en corteza y pulpa de cacao utilizando a. *Trichoderma viride* b. *B. quercum* frente *M. roseri*, *F. solani* y *A. flavus*. Ct: Control positivo (inóculo solo de hongos fitopatógenos tanto en pulpa como en corteza). R1-R3: réplicas



Fuente: Equipo investigador

4. Discusión

En las pruebas realizadas con el antagonista *T. viride*, se pudo determinar que este ejerce un mayor control sobre el crecimiento de patógenos secundarios, que pudieran afectar la corteza del cacao. Comparando los resultados con otras investigaciones se ha evidenciado que, por ejemplo, *Trichoderma asperellum* produce metabolitos secundarios con capacidad de inhibir a *Aspergillus flavus*. Este fenómeno se debe a la formación de compuestos activos excretados por *Trichoderma* sp. como enzimas o antibióticos que dañan e interrumpen el proceso fisiológico de *A. flavus* (Darmayasa y Oka, 2016).

En el caso que el hongo patógeno invada tejidos internos como la pulpa, estos tienden a competir eficientemente por sustrato, creciendo rápidamente y, por tanto, limitan la antibiosis de *Trichoderma viride* (Figura 1). Estos resultados coinciden con lo reportado por Aini FN y colaboradores, quienes estudiaron la actividad antagonista y endofítica de una especie de *T. harzianum* sobre cacota y semillas de cacao infectadas por *Phytophthora palmivora*. Los autores concluyeron que *T. harzianum* en concentraciones de 10^8 a 10^{10} esporas/mL en semillas de cacao, no produjeron resistencia contra el patógeno (Aini FN *et al.* 2020).

El mecanismo de inhibición que emplean los hongos antagonistas como *Trichoderma* sp. ha sido ampliamente estudiado. El hongo produce metabolitos tales como: celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas con actividad antifúngica; compite por espacio y nutrientes, hace micoparasitismo, promueve el crecimiento de la planta e induce genes implicados en la respuesta frente a estrés biótico y abiótico (Szekeres, *et al.* 2006). En esta investigación se apreció la competencia por nutrientes, como el mayor mecanismo de acción biocontroladora sobre los patógenos objetos de estudio. Para poder determinar la liberación de compuestos inhibitorios, se requiere de investigaciones posteriores.

En las pruebas realizadas con el endófito *B. quercum*, se pudo determinar que este presenta una mayor velocidad de crecimiento en corteza (color blanco y textura algodonosa), por encima de *M. roreri*, *F. solani* y *A. flavus*, mientras que en pulpa los tres fitopatógenos logran crecer de manera paralela (Figura 1). La capacidad de inhibición de este patógeno está dada de forma directa a través de procesos de antibiosis, competencia por sustrato, micoparasitismo o indirectamente induciendo resistencia intrínseca en el huésped frente al ataque de patógenos (Mejía LC *et al.*, 2008). Al realizar los ensayos de inhibición se pudo evidenciar, que el mecanismo más común empleado por *B. quercum* sobre los fitopatógenos analizados fue al igual que *T. viride* la competencia por sustrato, es decir directa (Figura 3B). Esto es similar a lo reportado por Mejía L.C. y colaboradores, quienes compararon el efecto inhibitorio de diferentes morfoespecies endofíticas sobre fitopatógenos primarios del cacao (Mejía LC *et al.*, 2008). Simamora A, y colaboradores también reportaron que el mecanismo de competencia por

sustrato fue el predominante en 5 hongos endofíticos entre los cuales se encuentran especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Ramichloridium* sobre *P. palmivora*, donde los endofíticos ganaron espacio de manera más rápida que el patógeno (Simamora A *et al.* 2021).

A través de los resultados obtenidos en este estudio, se confirma que el control biológico no elimina las posibles enfermedades a las que pueda ser susceptible el cultivo de cacao, en este caso específicamente, la moniliasis y la incidencia de patógenos secundarios. Sin embargo, se cree que podría ayudar a mitigar la acción que ejercen el hongo patógeno primario *M. rozeri*. Este se caracteriza por tener dos fases de crecimiento, una biotrófica, en la que el micelio coloniza el espacio intercelular y una fase necrotrófica, en la que el hongo invade el tejido a nivel intracelular, provocando una necrosis y por ende muerte de los tejidos involucrados (Barbosa, 2018). Al reducir la acción del patógeno primario, se limitaría también la acción de patógenos secundarios, los cuales contribuyen con el proceso de degradación del fruto iniciado por el patógeno primario y además, pueden dejar trazas contaminantes como micotoxinas en la semilla. Por tanto, se plantea la hipótesis de si una aplicación mixta del endofito *B. quercum* junto con el antagonista *T. viride*, podría minimizar la acción invasiva de los patógenos primarios en el cacao en su fase biotrófica y de esta manera, la acción de los patógenos secundarios.

5. Conclusiones

Se logró evaluar a nivel *in vivo*, el efecto biocontrolador de dos hongos con comportamiento antagonista y endofítico, frente a un patógeno primario y dos secundarios; todos autóctonos de cultivo de cacao de la región. El mecanismo de acción de los dos hongos se caracterizó por la competencia por sustrato, demostrando un mayor efecto protector en corteza de cacao. De acuerdo a los resultados obtenidos, se hace necesario llevar estos hongos a fase de campo a fin de analizar su comportamiento *in situ* y de esta manera, dimensionar el posible escalado de una suspensión biológica que pudiera aplicarse de manera preventiva, para ayudar a reducir y/o mitigar el impacto de patógenos primarios y secundarios sobre el cultivo.

REFERENCIAS

Aini, F.N., Sulistyowati, E., Oktaviana, S., Wulandari, N.D.F. (2020). Biological control of cocoa pod rot, *Phytophthora palmivora*, using *Trichoderma harzianum* como endofítico. ACIAR Proceedings Series. 149: 61-67. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20203545970>

Chaithra, M., Vanitha, S., Ramanathan, A., Jegadeeshwari, V., Rajesh, V., Hegde, V., Apshara, E. (2020). Morphological and Molecular Characterization of Endophytic Fungi Associated with Cocoa (*Theobroma cacao L.*) in India. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 38(6): 1-8. DOI: 10.9734/cjast/2019/v38i630447

Darmayasa, I. & Oka, I. (2016). A Study on Inhibitory Effect of *Trichoderma sp.* TKD on *Aspergillus flavus* FNCC6109 and Its Molecular Identification. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 4(2): 103–110. doi: <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.2254>

Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.M., McCraw S.L., Gurr, S.J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*. 484:186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>

Fisher, M.C., Hawkins, N.J., Sanglard, D., Gurr, S.J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360: 739–742. DOI: 10.1126/science.aap7999

Hawksworth, D., Lucking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum Journal*, 5(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.-FUNK-0052-2016

Hermosa, R., Belén-Rubio, M., Cardoza, R.E., Nicolás, E., Monte, E., Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the cost of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16: 69-80. DOI: 10.2436/20.1501.01.181

Hou, Q., Kolodkin-Gal, I. (2020). Harvesting the complex pathways of antibiotic production and resistance of soil bacilli for optimizing plant microbiome. *FEMS Microbiology. And Ecology*, 96:142. DOI: 10.1093/femsec/fiaa142

ICA. (2012). Manejo Fitosanitario del cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*). Medidas para la temporada invernal. 40p. Recuperado de [https://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/-](https://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/)

López-Ferrer, U.C., Brito-Vega, H., López-Morales, D., Salaya-Domínguez, J. M., Gómez-Méndez, E. (2017). Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestales-Cacaotal como un agente antagonico. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 20 (1):91-100. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/939/93950595003.pdf>

Mejía, L.C., Rojas, E.I., Maynard, Z., Van Bael, S., Arnold, S.E., Hebbbar, P., Samuels, G.J., Robbins, N., Herre, E.A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. Biological Control. 46(1): 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>

Osorio A.C., Triana, A.V., Jiménez, L.A., Ramírez., C.A. Identificación de hongos endófitos presentes en mazorcas de *Theobroma cacao* de los municipios de Maceo y San Pedro de Urabá, Antioquia. Recuperado de https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/23969/1/TrianaAndrea_2021_HongosEnd%C3%B3fitosCacao.pdf

Rojas, S.A., Villa, J.A. (2016). Evaluación de *Trichoderma* spp como Control Biológico en una Plantación a Pequeña Escala de Cacao. Journal of Agriculture and Animal Sciences. 5:2. Recuperado de <http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1835/1/1183-4059-1-PB.pdf>

Santos, A., García, M., Cotes, A.M., Villamizar, L. (2013). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis Th003* y *Trichoderma asperellum Th034*. Revista Iberoamericana de Micología, 29(3):150-156. DOI: 10.1016/j.riam.2011.11.002

Seng, J., Herrera, J., Vaughan, C.S., McCoy, M.B. (2014). Use of *Trichoderma* fungi in spray solutions to reduce *Moniliophthora roreri* infection of *Theobroma cacao* fruits in Northeastern Costa Rica. Revista de Biología Tropical, 62 (3): 899-907. Recuperado de <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v62n3/a06v62n3.pdf>

Simamora, A., Mayavira, S.V., Hahuly. V., Julinda, B.D. (2021). Endophytic fungi as potential biocontrol agents of *Phytophthora palmivora* in the cocoa plant. Biodiversitas, 22 (5): 2601-2609. DOI <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220519>

Syed-Ab-Rahman, S.F., Chua, E.T. & Schenk, P.M. (2021). Characterisation and isolation of bioactive compounds of anti-oomycete bacterial isolates inhibiting the growth of *Phytophthora capsici*. Australasian Plant Pathology, 50, 651-659. <https://doi.org/10.1007/s13313-021-00806-z>

Szekeres, A., Leigeb, B., Kredics, L., Manczinger, L., Vagvolgy, C. (2006). A Novel, image analysis based method for the evaluation of *in vitro* antagonism. *Journal of Microbiological Methods*. 65 (3): 619-622. Recuperado de <http://publicatio.bibl.u-szeged.hu/id/eprint/358>

Villamizar, R., Ortíz, O., Escobar, J.W. (2017). Symbiotic and endophytic fungi as biocontrols against cocoa (*Theobroma cacao L.*) phytopathogens. *Summa Phytopathologica*, 43 (2):87-93. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2175>

Villamizar, R.A., Osma, J.F., Ortíz, O.O. (2019). Regional evaluation of fungal Pathogen incidence in colombian cocoa crops. *Agriculture*. 9(3): 1–11. <https://doi.org/10.3390/agriculture9030044>



CAPÍTULO IV

**Control biológico de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*
a través de aceites esenciales**





Control biológico de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora* a través de aceites esenciales

Raquel Amanda Villamizar Gallardo

*Grupo de Investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible
Universidad de Pamplona, campus Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.*

1. Introducción

La necesidad de disminuir el control químico en la agricultura, ha aumentado el interés por el uso de métodos verdes que sean efectivos, pero a la vez amigables con el ambiente. Uno de estos, se basa en la utilización de aceites esenciales (AEs), definido por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO 9235:2013), como “*Producto oloroso, generalmente de composición compleja, obtenido a partir de una materia prima vegetal definido botánicamente, por destilación con vapor, por destilación seca, o por un proceso mecánico apropiado sin calentamiento. Los aceites esenciales normalmente se separan de la fase acuosa mediante un proceso físico que no afecta significativamente a su composición.*”

Químicamente son una compleja mezcla de compuestos polares y no polares. Dentro de su composición contienen terpenos (monoterpenos C₁₀ y sesquiterpenos C₁₅), compuestos aromáticos (aldehído, alcohol, fenol, y derivados de metoxi) y terpenoides (isoprenoides). La mayoría de los AEs

contienen monoterpenos y sesquiterpenos, los cuales son C₁₀H₁₆ y C₁₅H₂₄, respectivamente. En menor cantidad se encuentra la presencia de diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (Tongnuanchan P & Benjakul S. 2014).

En el caso específico de aquellos aplicados en la agricultura, se ha reportado que pueden actuar como bactericidas, virucidas, antiparasitarios, insecticidas y/o fungicidas (Santamarta and Aldavero, 2020). Su uso como protector frente al ataque de hongos patógenos ha sido ampliamente investigado (Ibáñez and Blázquez, 2021; Ebani and Mancianti, 2020; Karpiński, 2020; Elshafie and Camele, 2017; Lozada *et al.*, 2012). La actividad antifúngica de los AEs se atribuye a la relación de terpenos/terpenoides los cuales, debido a su naturaleza altamente lipofílica y su bajo peso molecular, son capaces de causar disrupción de la membrana celular, produciendo la muerte o inhibiendo la esporulación y germinación de las esporas fúngicas (Nazzaro *et al.*, 2017). En la tabla 1 se presentan algunos trabajos desarrollados por investigadores alrededor del mundo sobre la utilización de diferentes AEs en sistemas agrícolas de cacao.

Tabla 1

Estudios sobre el uso de aceites esenciales con propiedades antifúngicas sobre patógenos del cultivo de cacao

Aceite esencial	CMI	% inhibición	Patógeno	Referencia
<i>Cinnamomum verum</i>	CMI ₉₅ 172.1 µL/L	100	<i>Moniliophthora roreri</i>	Gómez-López <i>et al.</i> , (2020)
<i>Lippia alba</i>	CMI ₉₅ 53,866 µL/L	100		
<i>Origanum vulgare L.</i>	CMI ₉₅ 262.4 µL/L	100		
<i>Schinus molle L</i>	CMI ₉₅ 163.3 µL/L	100		
<i>Syzygium aromaticum</i>	CMI ₉₅ 167.4 µL/L	100		
<i>Thymus vulgaris L.</i>	CMI ₉₅ 107.6 µL/L	100		
<i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Ocimum gratissimum</i> y <i>Eucalyptus citriodora</i>	3 mL/L y 5 mL/L	100	<i>Phytophthora palmivora</i> y <i>Phytophthora megakarya</i>	Coulibaly K <i>et al.</i> , 2021
<i>Cymbopogon citratus</i>	500 µL/mL	95 — 24	<i>Moniliophthora roreri</i> <i>Phytophthora sp</i>	Scalvenzi, Yaguache- Camacho, Guerrini, Radice, & Chiurato, 2016

Fuente: Equipo investigador

De acuerdo a los antecedentes presentados anteriormente, se puede evidenciar que los AEs se perfilan como una estrategia eco-sostenible que podría reemplazar a los fungicidas convencionales, con tasas de inhibición del crecimiento fúngico de hasta el 100 %. Para nuestro conocimiento, en la región de Norte de Santander no existen publicaciones sobre el uso de estos compuestos naturales en el control biológico de patógenos del cacao específicamente. Por tanto, a través de este estudio se aborda el uso de estas soluciones oleosas, como estrategia eco-amigable para el control *in vitro* del crecimiento de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*, patógenos que afectan el cultivo de cacao en algunas zonas de la región.

2. Metodología

2.1. Obtención de los hongos patógenos

Moniliophthora roreri y *Phytophthora palmivora* fueron provistos por el Laboratorio de Nanotecnología y Gestión Sostenible de la Universidad de Pamplona, quienes reportaron su aislamiento e identificación a partir de mazorcas de cacao enfermas, provenientes de diferentes fincas cacaoteras del departamento Norte de Santander (Villamizar R *et al.*, 2019).

2.2. Obtención de los aceites esenciales

Los aceites esenciales fueron proporcionados por la empresa PROMITEC “Soluciones Biotecnológicas Naturales que brindan bienestar y salud” ubicada en la ciudad de Bucaramanga. El proceso de obtención de los mismos está basado en procesos de hidro-destilación de semillas, hojas y/o flores de plantas aromáticas. En la tabla 2 se relacionan los quimiotipos de los aceites empleados. Se ha asignado una letra a cada uno, a efectos de protección intelectual por búsqueda de patente del producto.

Tabla 2*Quimiotipos de los aceites esenciales empleados*

Código	Componentes principales	Clase de actividad
AE-01	Timol y carvacrol	General
AE-02	Piperitona Geranial, neral	General
AE-03	Eugenol, acetil eugenol, beta-cariofileno y vainillina.	General
AE-04	Geraniol, farnesol, citronel	Amplio espectro de bacterias y hongos, virus
AE-05	Anetol, estragol	Bacterias, levaduras y hongos.

Fuente: Equipo investigador

2.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales

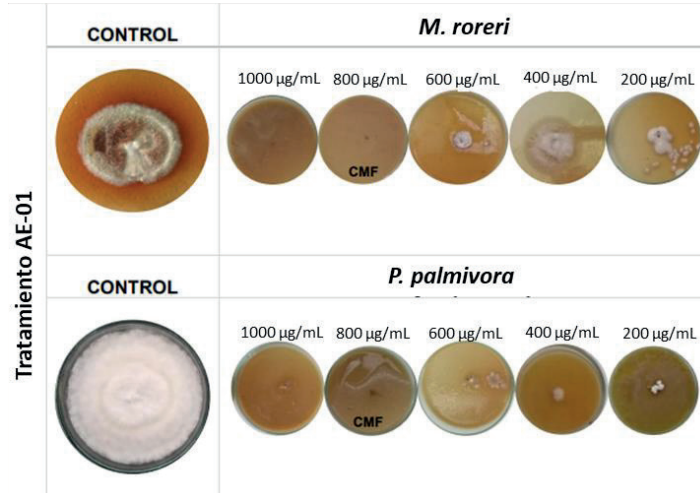
Se empleó la técnica de macro dilución en agar reportada por Ponce y colaboradores (Ponce *et al.*, 2003) con algunas modificaciones. Se prepararon 100 mL de agar malta (modificado con corteza de cacao), al cual se le adicionó cada uno de los aceites a diferentes concentraciones (1000 µg/mL hasta 200 µg/mL.) Las concentraciones fueron ajustadas en función del tipo de aceite. El medio fue plaqueado en cajas de Petri y seguidamente se realizó inoculación por punción directa de los diferentes patógenos (*M. royeri* y *P. palmivora*) con 14 días de incubación a 25 °C. Durante este período de tiempo se determinó el crecimiento de cada patógeno de acuerdo al control. Cada ensayo se realizó por quintuplicado. La concentración mínima fungicida (CMI) fue tomada como aquella capaz de inhibir completamente el desarrollo fúngico sobre el medio de cultivo (Ponce *et al.*, 2003).

3. Resultados

Se pudo comprobar que empleando el AE-01 fue posible inhibir el 100 % del crecimiento fúngico a una CMI de 800 µg/mL tanto para *M. royeri* como para *P. palmivora* (Figura 1).

Figura 1

Concentraciones mínimas inhibitorias de AE-01 frente a *M. royeri* y *P. palmivora*

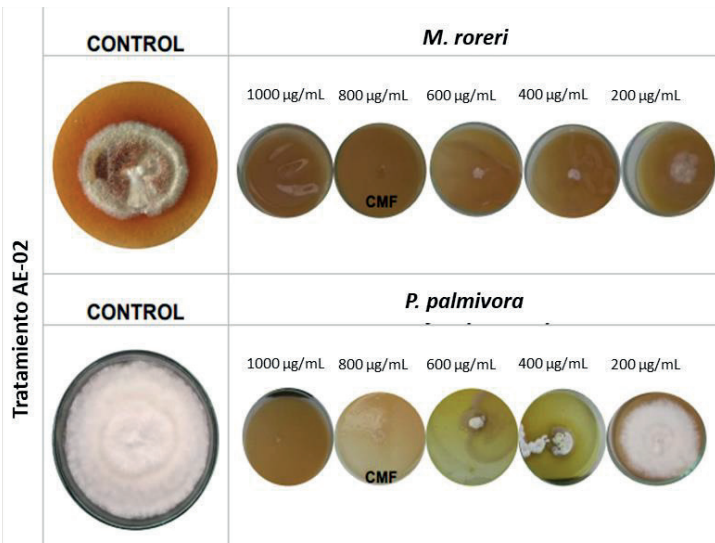


Fuente: Equipo investigador

En cuanto a la inhibición del AE-02, se evidenció un comportamiento similar a AE-01, siendo igual su CMI de 800 µg/mL (Figura 2).

Figura 2

Concentraciones mínimas inhibitorias de AE-02 frente a *M. royeri* y *P. palmivora*

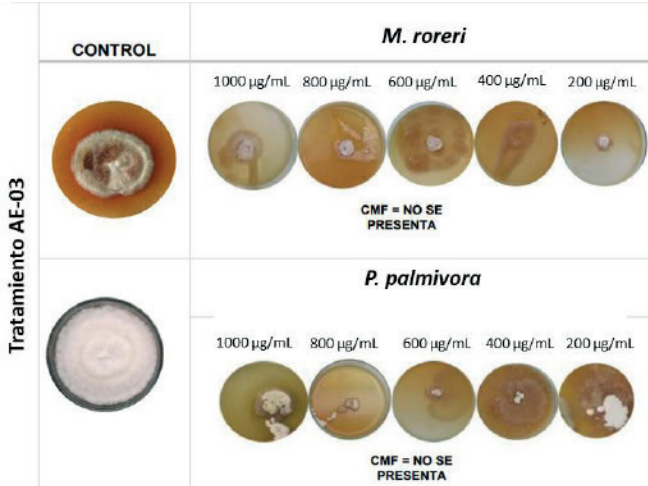


Fuente: Equipo investigador

En la figura 3, se logra observar que el AE-03 produjo cambios en la conidiación (más escasa), produciendo despigmentación y una ligera reducción y/o aumento en la velocidad de crecimiento con respecto al control.

Figura 3

Concentraciones mínimas inhibitorias de AE-03 frente a M. roseri y P. palmivora

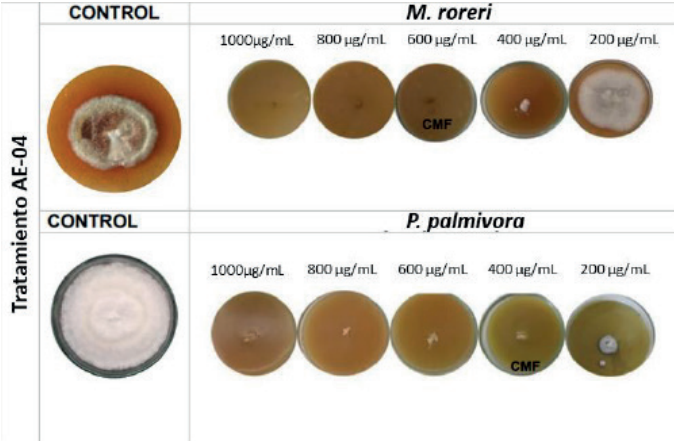


Fuente: Equipo investigador

En los resultados obtenidos con el tratamiento AE-04 se logra apreciar que el crecimiento de *M. roseri* es inhibido en una CMI de 600 µg/mL mientras que para *P. palmivora* se requirió una CMI de 400 µg/mL (Figura 4).

Figura 4

Concentraciones mínimas inhibitorias de AE-04 frente a M. roseri y P. palmivora

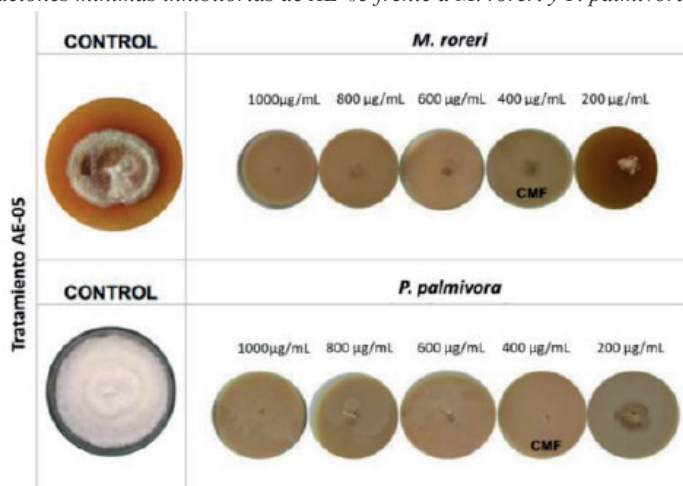


Fuente: Equipo investigador

En la figura 5 se logra observar el efecto anti fúngico del AE-05 para *M. roleri* y *P. palmivora*. Se logró determinar que empleando una CMI de 400 $\mu\text{g/mL}$ del AE es suficiente para generar un inhibir el crecimiento de los dos patógenos.

Figura 5

Concentraciones mínimas inhibitorias de AE-05 frente a M. roleri y P. palmivora



Fuente: Equipo investigador

4. Discusión

El efecto inhibitorio de los AEs depende de su composición y concentración. Así mismo, el tipo de patógeno también influencia la acción de los AEs ya que estos pueden exhibir características específicas de resistencia y/o susceptibilidad, frente a los diferentes compuestos presentes en la solución oleosa. En el caso de AE-01, cuyos quimiotipos principales fueron el timol y carvacrol, se observó un efecto inhibitorio del 100 % del crecimiento fúngico a 800 $\mu\text{g/mL}$. La literatura reporta que compuestos como el carvacol, timol han demostrado una total inhibición del crecimiento micelial a diferentes concentraciones. El timol altera la permeabilidad de la membrana celular, así como la formación de tubos germinales, estructuras indispensables en los hongos para el inicio de la infección en los tejidos vegetales. Además, es un potencial inhibidor de la pectin-metil-esterasa, enzima que modifica el grado de metil-esterificación de las pectinas, los cuales son los

principales componentes de las paredes celulares de los hongos, lo que provoca cambios en la adhesión celular, y la plasticidad (Stashenko, E. *et al.*, 2014). Numpaqué MA y colaboradores consideran que el carvacrol (isómero del timol) puede ejercer una actividad como intercambiador de protones, al reducir el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, lo que ocasiona un colapso en la fuerza motriz de protones y la muerte celular (Numpaqué MA *et al.*, 2011). Lozada *et al.* reportaron que al usar aceites esenciales de *Aloysia citriodora* Palau (800 µg/mL), *L. origanoides* Kunth (1000 µg/mL) y *L. alba* (200 µg/mL), cuyos quimiotipos son similares a los mencionados anteriormente, se presentaba un efecto fungicida sobre el crecimiento y germinación de *M. royeri* (Lozada *et al.*, 2014). Gómez-López *et al.*, demostraron también que aceites provenientes de *O. vulgare*, *S. aromaticum*, *T. vulgaris* y *C. verum* inhibieron el crecimiento total de *M. royeri* a partir de 500 µL/L en medio de cultivo PDA (Gómez-López A *et al.*, 2020).

El AE-02, cuya composición se basa en piperitona geranial y neral mostraron resultados que coinciden ligeramente con Lozada y colaboradores, quienes obtuvieron inhibición de 53.43 % para *M. royeri*, empleando Aceites Esenciales con el mismo quimiotipo, y la misma concentración (Lozada *et al.*, 2012). Por su parte, el AE-03, cuyos quimiotipos mayoritarios son eugenol, acetil eugenol, beta-cariofileno y vainillina, exhibieron un comportamiento diferente al reportado por Hassani y colaboradores, quienes emplearon estos quimiotipos y otros, para controlar el crecimiento de *M. fructicola* y *B. cinerea*, logrando que a una concentración de 600 µg/mL se inhibiera el crecimiento de los dos patógenos durante almacenamiento post-cosecha.

El AE-04 es un aceite basado en geraniol, farnesol, citronel que proviene de una hierba perenne, ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales. Pandey y colaboradores, realizaron el tamizaje de 11 tipos de aceites contra el hongo micotoxigénico *Aspergillus flavus*, demostrando que aquellos aceites que contenían geranial y neral exhibieron efecto fungistático y fungicida en concentraciones de 0,14 µL/mL y 0,28 µL/mL, respectivamente (Pandey *et al.*, 2016). Finalmente, el AE-05 cuyos quimiotipos son el anetol y estragol, exhibieron un efecto similar al reportado por

Nascimento y colaboradores, quienes encontraron la inhibición del crecimiento total del micelio de *F. solani* f. sp. *Glycines*. No obstante, las concentraciones empleadas por estos investigadores fueron inferiores (6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Nascimento *et al.*, 2016), a las reportadas en este estudio, contra *M. roreri* y *P. palmivora* (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las diferencias obtenidas se pueden atribuir al tipo de microorganismo y al origen de la planta de donde se obtuvo el aceite, que de acuerdo a la literatura puede inferir en la concentración del quimiotipo y, por tanto, es su acción inhibitoria.

5. Conclusiones

Se logró evaluar el efecto inhibitorio de 5 aceites esenciales sobre dos hongos patógenos primarios del cultivo de cacao y se pudo comprobar que aquellos cuyos quimiotipos se basan en timol, carvacrol, p-cimeno y estragol, logran inhibir exitosamente el crecimiento fúngico, siendo consistente con resultados reportados por otros investigadores. Esto permitió identificar una alternativa altamente efectiva y eco-amigable que puede aplicarse *in situ* como método de control biológico en cultivos de cacao infestados por moniliasis y mazorca negra, en el departamento Norte de Santander.

REFERENCIAS

Coulibaly, K., Koffi, F.J.M., Ouattara, A., Guiraud, B., Tahy, G., Kone, G., Ogbé, D.B., N'Guessan, W., Acka, K., Assi, M.E., Kouame, N., Konate, I., N'Guessan, F. (2021). Comparative efficacy of essential oils of three aromatic plants as alternatives in the control of *Phytophthora* sp. agent of cocoa tree (*Theobroma cacao* L.) black pod disease in Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(4): 1398-1409. DOI: 10.4314/ijbcs.v15i4.8

Ebani, V.V. & Mancianti, F. (2020). Use of Essential Oils in Veterinary Medicine to Combat Bacterial and Fungal Infections. *Veterinary Sciences*, 30 (4):193. doi: 10.3390/vetsci7040193

Elshafie, H.S. & Camele, I. (2017). An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *BioMedical Research International*. 2017: 9268468. DOI: 10.1155/2017/9268468

Gómez-López, A., Martínez-Bolaños, L., Ortiz-Gil, G., Martínez-Bolaños, M., Avendaño-Arrazate, C.M., Hernández-Meneses, E. (2020). Bioaceites esenciales inhiben a *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.*, causante de la moniliasis en el cultivo del cacao. *Acta Agrícola y Pecuaria*. 6: E0061016. Recuperado de <http://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/130>

ISO 9235: 2013; Aromatic natural raw materials – vocabulary

Karpiński, T.M. (2020). Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals. *Biomolecules*,10(1):103. doi: 10.3390/biom10010103

Lozada, B., Herrera, L., Perea, J.A., Stashenko, E., Escobar, P. (2012). *In vitro* effect of essential oils of Three Lippia species on *Moniliophthora roreri* (Cif. and Par.) Evans *et al.*, causing agent of Moniliasis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61 (2): 102-110. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28122012000200002&script=sci_abstract

Nascimento, D.M., Vieira, G.H., Kronka, A.Z. (2016). Inibicao do crescimento micelial de *Fusarium solani* f.sp.*Glycines*. *Revista de Agricultura Neotropical*. 2016.3(4): 65-68. DOI:10.32404/rean.v3i4.1195

- Nazzaro, F., Fratianni, R., Coppola, V., Feo. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*, 10(4):86. doi: 10.3390/ph10040086
- Numpaque, M.A., Oviedo, L.A., Gil, J., García, M., Durango, D.L. (2011). Timol y carvacrol: biotransformación y actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Colletotrichum acutatum* y *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology*, 36 (1):003-013. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000100001>
- Pandey, A.K., Sonker, N., Singh, P. Efficacy of some essential oils against *Aspergillus flavus* with special references to Lippia alba oil an inhibitor of fungal proliferation and aflatoxin B1 production in green gram seeds during storage. *Journal Food Science*. 2016. 81: M928-M934. DOI: 10.1111/1750-3841.13254
- Ponce, A.G., Fritz, C., del Valle, S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7): 679-684. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4)
- Santamarta, S., Aldavero, C., Rojo, M.A. (2020). Antibacterial Properties of Cymbopogon martinii Essential Oil against *Bacillus subtilis* Food Industry Pathogen. *Proceedings*. 66(1):1. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020066001>
- Scalvenzi, L., Camacho, B.Y., Guerrini, A., Radice, M., Chiuratto, M. (2012). Efectos de los aceites esenciales amazónicos de Citrus limon y Cymbopogon citratus sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 5(3): 206-217. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6067736>
- Stakhenso, E. & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de Lippia sobre *Moniliophthora roreri* (Cif Y Par) Evans *et al.*, agente causal de la moniliasis del cacao (*THEOBROMA CACAO L.*). *Acta Agronómica*, 61(2):102-110. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v61n2/v61n2a02.pdf>
- Tongnuanchan, P. & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79 (7): 1231-1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Villamizar, R.A., Osma, J.F., Ortíz, O.O. (2019). Regional evaluation of fungal Pathogen incidence in colombian cocoa crops. *Agriculture*, 9(3): 1–11. <https://doi.org/10.3390/agriculture9030044>



CAPÍTULO V

**Nanotecnología y su potencial
impacto en la agricultura de cacao**



CAPÍTULO V

Nanotecnología y su potencial impacto en la agricultura de cacao

Edgar E. González

Centro de Ciencia y Tecnología Nanoescalar, “nanoCITec”, Bogotá, Colombia. Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Bogotá, Colombia. egonzalez@nanocitec.org

1. Introducción

La nanotecnología se ha posicionado desde comienzos del presente siglo, como una de las tecnologías emergentes estratégicas para hacer frente a los desafíos en materia de energía, agricultura, ambiente, salud y desarrollo industrial en general. Desde que se implementaron las iniciativas nacionales para trazar la hoja de ruta en inversión, formación y desarrollo científico y tecnológico en Nanotecnología, el camino recorrido hasta ahora ha mostrado una trayectoria de tránsito por un elevado pico de expectativas y en algunos casos limitados avances en selección y adopción (González, 2021). Específicamente en el contexto de la actividad agrícola, la oferta de posibilidades que ofrecen las tecnologías nanoescalares emergentes ha abierto un amplio espectro de potenciales aplicaciones, las cuales prometen mejorar sustancialmente la producción y seguridad alimentaria.

Para contextualizar el papel de la nanotecnología en el sector agrícola y específicamente en la producción del cacao, se hace necesario establecer los aspectos en torno a los cuales se valoran los aportes de esta tecnología emergente. Una de las problemáticas en las que resulta relevante el aprovechamiento de las capacidades que ofrece la tecnología nanoescalar es el relacionado con la contaminación de suelos, agua y aire, producida por vía natural o antrópica. Este aspecto afecta drásticamente la calidad de los productos agrícolas, tanto en fase de cultivo como en posteriores etapas de procesamiento. Entre los principales contaminantes que se incorporan en la cadena alimentaria, se destacan los metales pesados y metaloides, que, por su toxicidad, comprometen la inocuidad alimentaria y en consecuencia la salud de los seres humanos expuestos.

En este capítulo se presenta el potencial impacto de la tecnología nanoescalar para afrontar el problema de contaminación del cacao por metales pesados, específicamente el cadmio (Cd) y el plomo (Pb). Se orienta la oferta nanotecnológica para monitoreo y medición, así como las contribuciones a la fertilización controlada. Estos avances permitirán abrir escenarios de mitigación y remediación a la contaminación causada por la exposición de los cultivos de cacao a metales pesados y metaloides.

2. Metales pesados en cultivo de cacao

En lo que se refiere a la producción agrícola del cacao y productos derivados, la contaminación por metales pesados que afecta la cadena de valor de los cultivos, exige la implementación de estrategias de gestión y recursos tecnológicos de detección y medición. Entre los metales pesados y metaloides que forman parte de ranking de contaminantes peligrosos no esenciales para el metabolismo se destacan: mercurio (Hg), cromo (Cr), Cd, Pb, arsénico (As). La tabla 1 muestra algunos de los valores reportados en diferentes países del mundo, de concentraciones de metales pesados en granos de cacao y productos derivados.

Tabla 1*Concentraciones de metales pesados y metaloide en cacao reportada en diferentes países*

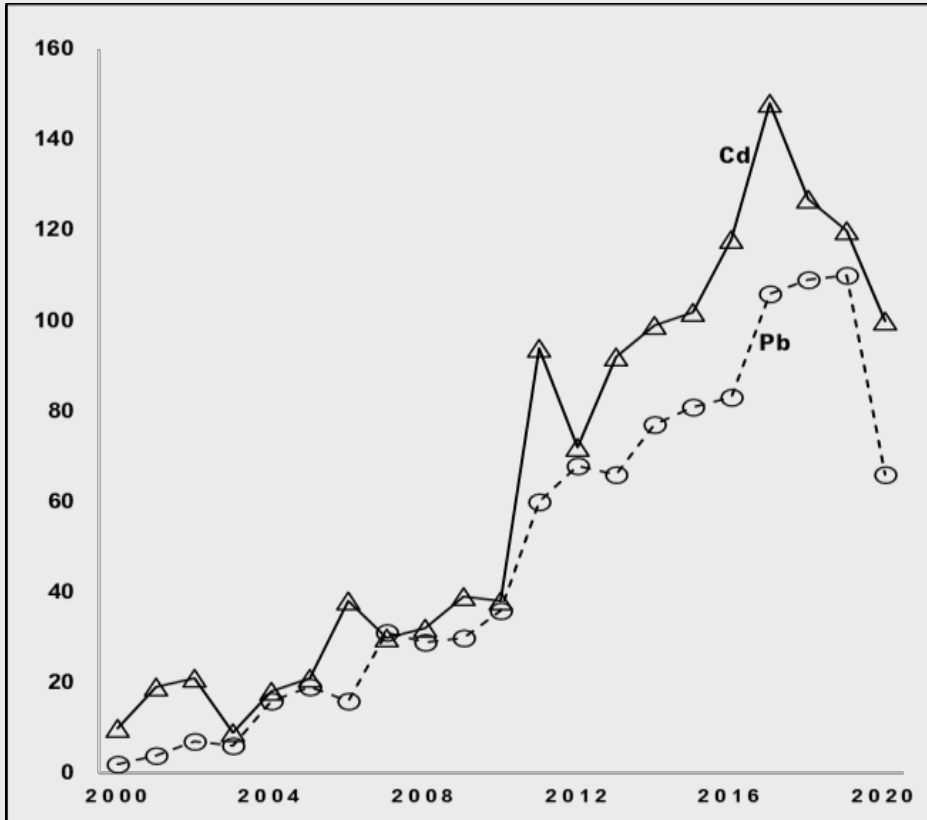
Contaminante	País	Concentración (mg kg ⁻¹)		Referencia
Cd	Colombia	Hojas	0.43	Aguirre, <i>et al.</i> , (2020)
		Granos	0.67	
		Frutos	0.5	
Cd	Ecuador	Granos	0.02-3	Chávez <i>et al.</i> , (2015)
Cd	USA	Cacao/Chocolate Comercial	0.04-3.15	Abt, <i>et al.</i> , (2018)
Cd		Cacao/Chocolate Comercial	<LOD-0.38	
Cd	Perú	Granos	1.55	Huamani <i>et al.</i> , (2012)
		Granos	0.2-12.56	Zug <i>et al.</i> (2019)
Cd	Honduras	Granos	1.1	Gramlich <i>et al.</i> , (2018)
Cd	India	Chocolate comercial (diferentes marcas)	0.001-2.73	Dhiya <i>et al.</i> , (2005)
Ni			0.41-8.29	
Pb			0.049-8.04	
Pb	Trinidad y Tobago	Tejidos de cacao	0.54-5.21	Ramtahal <i>et al.</i> , (2016)
Cd	Indonesia	Granos	0.05	Assa <i>et al.</i> , (2018)
Pb			0.10	
As			0.01	
Hg			0.005	
Pb	Nigeria	Chocolate comercial	0.23	Rankin <i>et al.</i> , (2005)
Pb	Brasil	Chocolate comercial	0.021-0.138	Villa <i>et al.</i> , (2014)
Cd	Japón	Chocolate comercial	2.3	Kataoka <i>et al.</i> , (2018)
As	Malasia	Granos	0.01	Mohamed <i>et al.</i> , (2020)
		Muestras de chocolate	0.02	

Fuente: Equipo investigador

De otra parte, las rigurosas regulaciones para la comercialización de cacao y sus derivados impuestas en los países importadores, obligan a los agricultores y productores a monitorear la presencia de estos metales tanto en cultivos como en productos derivados. Se requiere además el uso de tecnologías que permitan mitigar y remediar las fuentes causales de exposición en los cultivos.

Figura 2

Productividad científica en contaminación de cd y pb en cacao y sus productos derivados para la ventana de vigilancia comprendida entre el año 2000 y 2020



Fuente: Equipo investigador

De los metales pesados, el Cd y Pb han sido dos de los contaminantes del cacao de mayor monitoreo, medición e investigación. La figura 2 muestra la productividad científica en contaminación causada por Cd y Pb en cultivos de cacao y subproductos, para la ventana de vigilancia entre 2000 y 2020. Desde la segunda década del presente siglo, la tasa aproximada de crecimiento en publicaciones para estos dos metales ha alcanzado los 10 artículos/año.

3. Contaminación del cacao por Cd y Pb

El Cd y Pb son considerados los principales agentes de contaminación en cultivos de cacao. La absorción de estos metales depende, entre otros aspectos, de la textura del suelo, pH, potencial redox, presencia de carbonatos, capacidad de intercambio catiónico/aniónico, contenido de materia orgánica, especiación química y prácticas agrícolas (Song, *et al.*, 2015).

Ya que el cacao se clasifica como *acumulador* de cadmio, este aspecto compromete seriamente la inocuidad alimentaria de los productos provenientes de este valioso recurso alimenticio con potencial bioacumulación en el cuerpo humano, donde este metal se mantiene con un tiempo de vida media superior a los 10 años. El Cd puede encontrarse en el aire atmosférico debido a emisiones producidas, entre otras fuentes, por quema de carbón, que produce potencial contaminación del suelo de cultivo y aguas expuestas por deposición aérea. Igualmente, contribuyen con esta contaminación los fertilizantes fosfatados¹ y algunos abonos provenientes de excreta animal. En forma natural, el Cd se encuentra en suelos en concentraciones inferiores a 1 mg kg⁻¹. Estas potenciales causales hacen que las plantaciones de cacao puedan estar expuestas a niveles de contaminación con un alto perfil de riesgo.

En cuanto a la variabilidad de niveles de Cd en función de la ubicación geográfica, se han reportado las más bajas concentraciones para el oeste de África, y el mayor valor en Sur América, incluyendo los productos originarios de esta región (Abt *et al.*, 2018). La ruta de ingreso del cd a la planta de cacao, que depende del genotipo, edad de la planta y tipo de nutrientes disponibles inicia en la raíz, avanza a los tejidos, alcanza las hojas vía xilema y finalmente a los frutos a través del líber.

Aunque resulta de interés y urgencia mitigar el problema del cd en el cacao, aún no se cuenta con suficiente información que permita comprender

¹ Fertilizantes manufacturados a partir de roca fosfórica puede contener hasta 400 mg kg⁻¹ de Cd.

la fenomenología involucrada con movilidad e internalización de este metal en las plantas. En Wade *et al.*, (2022), a partir de un estudio de vigilancia científico-tecnológica realizada en octubre 20 de 2020, se reporta el número de estudios realizados que contienen información sobre Cd disponible en el el suelo, total en el suelo, en hojas y en granos. Se identificaron 1113 registros con 457 artículos para evaluar los requisitos de elegibilidad. Finalmente, se seleccionaron 31 estudios con datos utilizables con un total de 2127 observaciones totales de 10 países. Se concluye que existen brechas de datos geográficos y metodológicos que pueden ser mejorados a futuro. Además, se recomienda tener en cuenta el Cd del subsuelo, el cual puede contribuir con la absorción del cacao de este metal. De otra parte, se destaca el papel de la acidez del suelo como un factor de solubilidad del Cd, lo cual acentúa la movilidad hacia la planta de cacao y su bioacumulación en hojas y granos. Se acentúa el hecho que con incrementos del $\text{pH} > 6.0$, se hace posible reducir el Cd en los granos, lo que puede lograrse con incorporación de cal al suelo de cultivo.

Para mitigar en regiones de Latinoamérica la contaminación por Cd del cacao y sus productos, Ecuador, Colombia y Costa Rica han creado la plataforma Multiagencial de Cacao para América Latina y el Caribe, orientada a coordinar actividades de gestión agronómica, calidad, normatividad, gobernanza y gestión del conocimiento. Dentro de uno de los aspectos relevantes en el componente de calidad y seguridad, se propende por la “incorporación y estandarización de metodologías de medición para generar mapas y tecnologías de reducción”. Para hacer realidad esta opción, se hace necesario contar con herramientas instrumentales y procesos de monitoreo y medición con capacidad de actuación en red en tiempo y lugar. Este monitoreo y medición debe ser realizada en suelo y agua, ambientes causales de la movilidad del Cd a las plantas de cacao.

Otro de los metales pesados que afectan la calidad e inocuidad del cacao, es el plomo. Este elemento puede encontrarse en forma natural en suelos en concentraciones en el rango de $2\text{-}200 \text{ mg kg}^{-1}$ (Mounicou *et al.*, 2002) y puede incrementarse por vía antrópica. Una de las fuentes de contaminación proviene de tetraetilo de plomo presente en la gasolina, el cual ha sido utilizado en algunos países productores de cacao. Sin embargo, en el año 2021

el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente anunció la erradicación de la gasolina con plomo, lo que va a producir un efecto de mitigación importante en la contaminación del cacao por Pb.

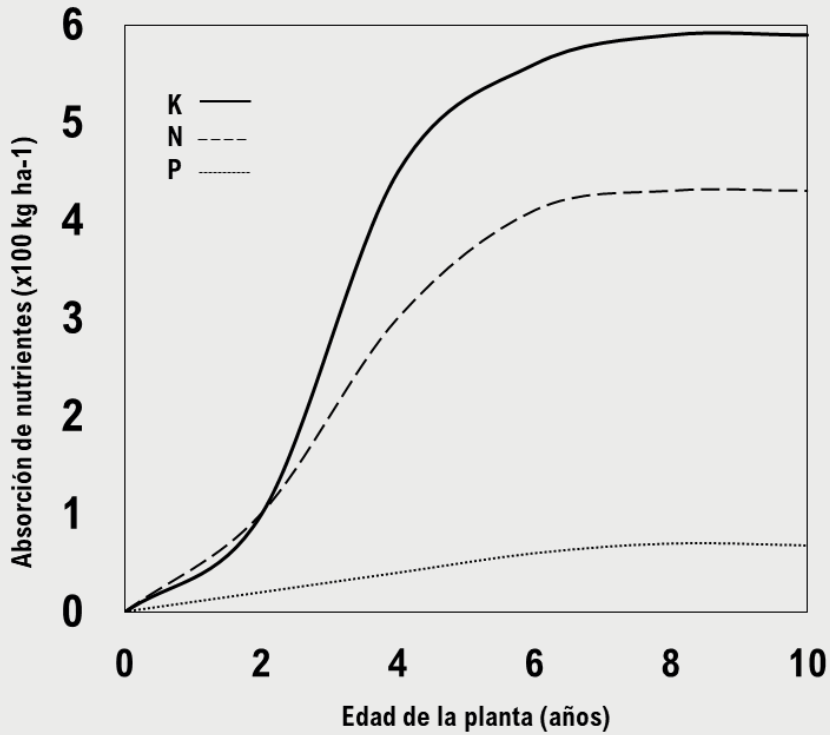
4. Nanotecnología para contribuir a la fertilización del cacao

La fertilización de cultivos de cacao, requiere de una evaluación previa de las condiciones naturales del suelo y requerimientos foliares, que permita valorar los niveles necesarios de fertilizante que deban ser aplicados. El suelo después de cada cosecha –principal e intermedia-, se empobrece en nutrientes y en capacidad de suministrar las condiciones suficientes para mantener el nivel de productividad requerido². Este empobrecimiento del suelo en fertilización, que se acentúa durante los primeros 5 años (figura 3) hace necesario la utilización de fertilizantes orgánicos y químicos, con dosificaciones que dependen, entre otros aspectos, de los resultados de análisis de suelos. La disponibilidad de estos fertilizantes aplicados, se reduce debido a escorrentía y otros factores ambientales. Algunas estimaciones indican pérdidas entre el 40% y 70% de nitrógeno (N), 80% y 90% de fósforo (P) y 50% y 70% de potasio (K), elementos que configuran el coctel NPK (Duhan *et al.*, 2017). Además, una inadecuada dosificación de estos compuestos posibilita la degeneración del suelo y potenciales efectos adversos debido a niveles de reactividad, causales de toxicidad a la microfauna, a las plantas dosificadas y contaminación de ambientes hídricos.

² De acuerdo a lo reportado en Borrero (2009), para producción de 1000 kg de semillas de cacao, se extrae del suelo valores cercanos a 44 kg de N, 10 kg de P₂O₅ y 77 kg de K₂O. Si se hiciera re-uso de las cáscaras y residuos de las mazorcas (fragmentadas en el mismo lugar de cultivo) para fertilización, se reciclarían 2 kg de N, 5 kg de P₂O₅ y 24 kg de K₂O. Esta diferencia entre el consumo de nutrientes por cosecha y el retorno por residuos, causa un importante deterioro de capacidad nutricional en el suelo.

Figura 3

Nutrientes absorbidos en kg ha⁻¹ de plantaciones de cacao en función de la edad de las plantas



Nota. Se hace notoria la elevada tasa de absorción durante los primeros 5 años, aspecto que propone acciones para un monitoreo frecuente de concentraciones de nutrientes disponibles en suelo, para una óptima dosificación. *Fuente:* Gráfica elaborada a partir datos reportados en (INPOFOS, 2007).

Para administrar de manera precisa la dosificación de fertilizantes aplicados en tiempo y lugar, se requiere:

- Información nutricional del suelo para determinar los valores óptimos requeridos que deben ser aplicados³. En general, cuando estos análisis de nutrientes en suelo no pueden ser realizados *in situ*, se hace necesaria la recolección de muestras y transporte a laboratorios especializados, lo que conlleva costos, demoras e imposibilidad para monitoreo continuo. Aunque ya existen en el mercado ofertas de instrumentación para censar *in situ* concentraciones de NKP en suelo, con resoluciones cercanas a 1 mg kg⁻¹ y precisión de $\pm 2\%$ F.S., aún se requiere mejorar la implementación de sistemas de menor costo, mayor sensibilidad y capacidades para monitoreo continuo en red.
- Mejorar la estabilidad y la cinética de liberación sostenida de los fertilizantes aplicados. Tanto la estabilidad como control en la liberación, se puede alcanzar con nanorecubrimientos con capacidad de favorecer la reducción de la velocidad de liberación. Esta línea estratégica de oferta para fertilización controlada ha tomado el nombre de nanofertilización.

5. Nanofertilizantes

De una deficiencia o sobreexposición se derivan problemas en el crecimiento y desarrollo de las plantas. En cuanto a prevención y mitigación, para controlar el aumento de concentración de metales y metaloides en suelos propiciada, en algunos casos, por el uso fertilizantes y plaguicidas; una de las opciones que se están consolidando es el desarrollo de productos para fertilización y control de plagas con capacidad de liberación controlada y, cuando se requiera, ralentización en la velocidad de entrega.

El encapsulamiento con el uso de nanorecubrimientos se configura como una alternativa de gran valor para liberación controlada y sostenida. En un primer tipo de morfología, el fertilizante ocupa el core de la cápsula mien-

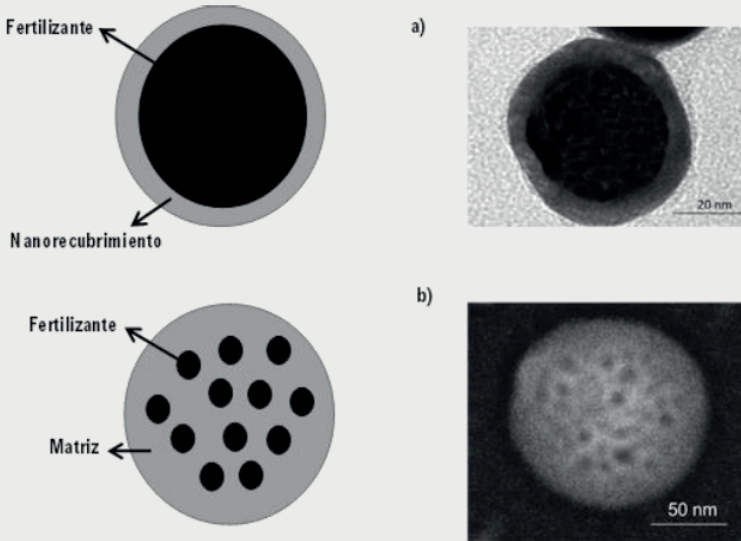
³ Algunos de los criterios que se tienen en cuenta para dosificar la fertilización: i) medición del nivel de nutrientes, iii) eficiencia en la movilidad de los fertilizantes del producto aplicado, iii) cantidades de fertilizante extraídos por las plantas.

tras que un segundo material, generalmente polimérico, se dispone como revestimiento o shell en varias capas (figura 4a). En Tomaszewska *et al.*, (2006) se reporta encapsulación de fertilizante granulado recubierto con Polisulfona. En función del número de capas se logró una reducción en la velocidad de liberación del fertilizante en un 25%.

Otra de las morfologías que están siendo desarrolladas para nanoencapsulación, es el uso de una matriz en la que se dispersa en forma homogénea el fertilizante formando una estructura multicore, tal como lo indica la figura 4b. Aprovechando las excepcionales propiedades eléctricas, bactericidas, de biodegradabilidad y absorción que exhibe el Quitosano, ya se han confeccionado nanopartículas esféricas de 78 nm de diámetro con excelentes resultados de estabilidad, coexistencia y lenta liberación del NPK (Corradi ni *et al.*, 2010). Se impide con este tipo de nanofertilizantes las pérdidas de nutrientes y se controla la interacción con el entorno, principalmente durante el periodo de mayor tasa de absorción con entrega de cada componente del coctel NPK, en la proporción requerida, de acuerdo con lo indicado en la figura 3.

Figura 4

Clasificación de las nanocápsulas en función de la morfología



Fuente: Equipo investigador

a) Encapsulamiento tipo monocore o core-shell, en la que el fertilizante conforma el core de la cápsula y un nanorecubrimiento controla y sostiene la entrega; b) El fertilizante es distribuido en forma homogénea en una matriz que controla y sostiene la entrega. Se muestran fotografías tomadas con microscopio electrónico de las dos configuraciones mencionadas, reproducidas con permiso de nanoCiTec.

6. Potencial impacto de la nanotecnología para monitoreo y remediación

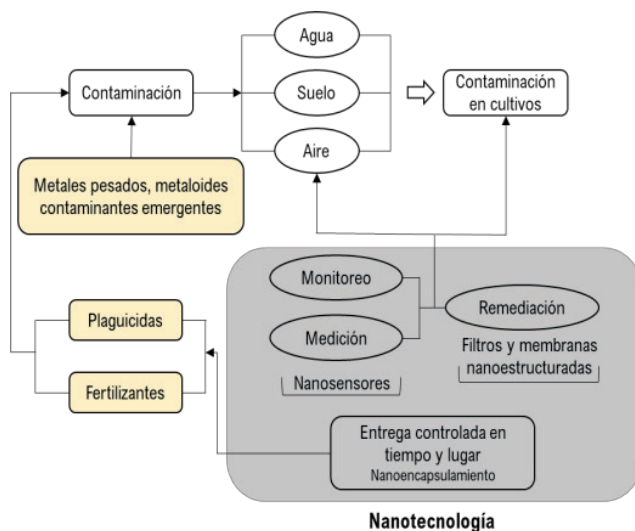
El monitoreo de contaminantes facilita la identificación de las fuentes originarias del agente contaminante, además, de proporcionar información y datos requeridos para investigar la movilidad, acumulación y distribución en tiempo y lugar. Desde la tecnología nanoescalar se hace posible el desarrollo de sensores con suficiente precisión, especificidad, operación *in situ* y portabilidad, los cuales hacen viable la implementación de redes de monitoreo para detección y medición. Con estas capacidades tecnológicas se hace posible el levantamiento de mapas de presencia y concentración de los contaminantes de interés.

En cuanto a remediación específicamente en aire y agua, el desarrollo de filtros y membranas nano-estructuradas con capacidad de remoción eficiente y selectiva, se encuentra en una fase de adopción para limpieza de volúmenes limitados de agua y aire. Sin embargo, con el uso de materia prima de origen vegetal (residuos derivados de la producción agrícola), se están confeccionando propuestas de filtrado con capacidad de remoción eficiente para volúmenes que pueden ser escalados progresivamente.

En lo referente al impacto causado por plaguicidas, herbicidas, reguladores de crecimiento, vacunas y fertilizantes, que en algunos casos son fuente de contaminación, el desarrollo de procesos y sistemas de encapsulamiento con liberación controlada se está fortaleciendo como opción de gran valor para avanzar en la consolidación de la agricultura de precisión. La figura 5 muestra las líneas de actuación de la nanotecnología para afrontar la problemática de contaminación de cacao por metales pesados y metaloides.

Figura 5

Oferta de la nanotecnología para afrontar el problema de contaminación de cultivos por metales pesados y metaloides proveniente, entre otros causales, por movilidad de contaminantes desde el agua, suelo o aire



Fuente: Equipo investigador

7. Nanosensores para monitoreo y medición

Según lo indicado, la movilidad de contaminantes al cacao tiene su origen en el suelo, aire o aguas contaminadas, con fuentes originarias de contaminación antrópicas y/o naturales. Para identificar estas fuentes y comprender las dinámicas de movilidad se requiere monitorear y medir en suelo, agua, aire y plantas, frutos y productos derivados la presencia de contaminantes. Así, para el caso del Cd y Pb en suelo, una de las metodologías utilizadas para medición conlleva la realización de los siguientes pasos metodológicos: i) recolección de las muestras a una determinada profundidad. Homogeneización y traslado al laboratorio. ii) Procesamiento, que incluye el secado y molienda para obtener la granulación apropiada. iii) Análisis químico, consistente en digestión de las muestras con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno. iv) Posteriormente, análisis por espectrofotometría de absorción atómica, que genera los valores de concentración correspondientes (Rosales *et al.*, 2021). Para la determinación de concentraciones de Cd y Pb en granos de cacao o productos derivados, se han validado entre otras

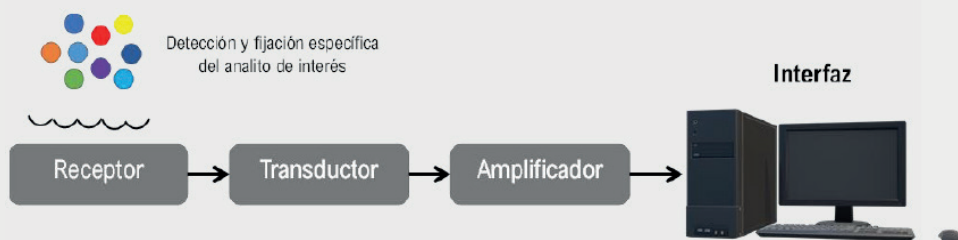
técnicas, la digestión ácida asistida por microondas antes de la cuantificación por ICP-MS. Esta metodología registra una elevada selectividad, linealidad y precisión aceptable. Se ha reportado el análisis de los metales pesados Cd, Hg, Sb y el metaloide As en granos de cacao, cacao en polvo y chocolate con límites para la cuantificación en el rango de 7,84 hasta 194.52 $\mu\text{g kg}^{-1}$ con desviación estándar relativa por debajo del 20% (Mohamend *et al.*, 2020).

En general, las técnicas utilizadas para medición de metales pesados en suelo, agua o plantas, aunque algunas de ellas de elevada precisión, presentan limitaciones en portabilidad, costo, transporte y pretratamiento de muestras, entre otras. Se requiere por lo tanto el desarrollo de dispositivos y procesos para medición *in situ*, monitoreo/medición continua, reducción de costos y facilidad de uso. La tecnología de la nanoescala proporciona las capacidades para dar cumplimiento con estos requisitos. La oferta en nanomateriales para la confección de dispositivos y procesos es una de las líneas de mayor proyección. Dentro de la amplia gama de nanomateriales se destacan, las nanopartículas, puntos cuánticos, nanotubos de carbono y grafeno. Aunque el estado del arte en el desarrollo de nanosensores para detección y medición de metales pesados, específicamente Cd y Pb en cacao, aun es deficiente, se hace posible la implementación para el cacao de las propuestas reportadas para otras plantas, productos agrícolas, suelo, aire o agua. Una completa descripción de estas capacidades desde la nanotecnología para nanocensado en ambiente y agricultura aparece reportado en Kumar *et al.*, (2021).

En la figura 6 se muestra el esquema de componentes de un sensor típico. Está conformado por un receptor con capacidad de detectar a través de interacciones -generalmente por transferencias de energía- la fijación selectiva del analito de interés. En general, para fijación y detección se hace uso de agentes moleculares con capacidad de “reconocimiento” de los analitos seleccionados para ser censados. El receptor produce una respuesta que debe ser traducida a una señal que pueda ser amplificada y codificada en una interfaz de lectura por parte del usuario. Dependiendo del tipo de respuesta del receptor y acción del transductor, los sensores pueden ser clasificados en: electroquímicos (amperiométricos, potenciométricos y conductométricos), ópticos (fluorescencia, colorimétricos) y de plasmón superficial, entre otros.

Figura 6

Componentes de un sensor típico para medición de analitos de interés



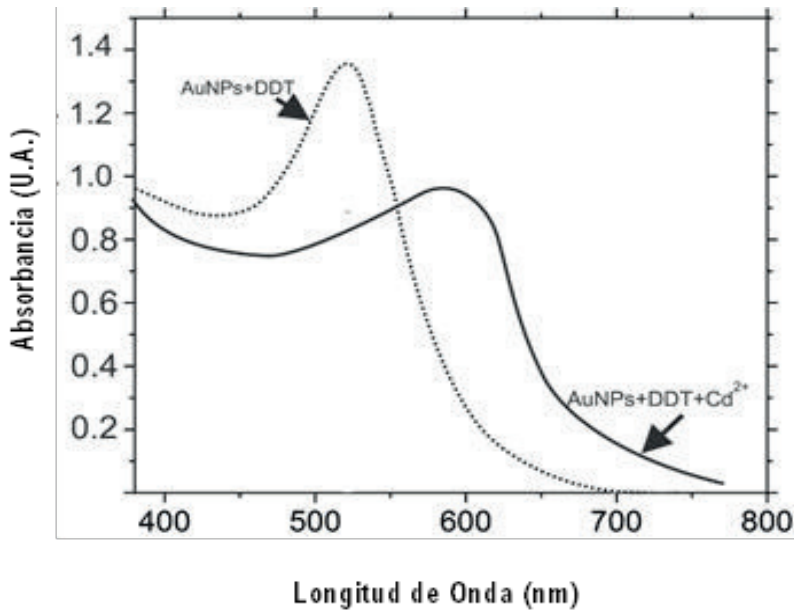
Fuente: Equipo investigador

En sensores electroquímicos potenciométricos, el transductor está conformado por electrodos confeccionados en base a membranas con materiales conductores de iones permselectivos. Para detección selectiva de Cd, se ha reportado el uso de membranas de poly (vinylchloride) con (E)-2-bencilidenedihidrazinacarbotoioamida sintetizada como ionóforo (Ozbek, *et al.*, 2020).

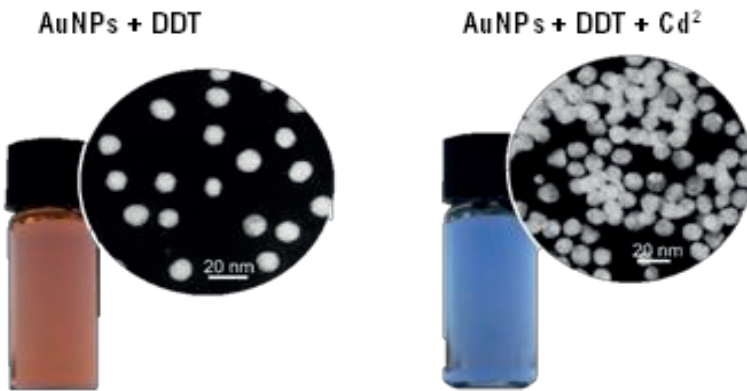
Para el caso de los sensores colorimétricos basados en nanopartículas, el transductor lo configura una dispersión coloidal de nanopartículas de oro, las cuales apropiadamente funcionalizadas -por ejemplo, con alcanetioles- se facilita el reconocimiento selectivo y fijación de los analitos de interés, los cuales propician agregados de nanopartículas con la consecuente variación en la coloración del coloide (González *et al.*, 2022).

La figura 7 muestra el desplazamiento del pico de resonancia de plasmón superficial para una dispersión acuosa de nanopartículas de oro funcionalizadas con 1,4-ditiotreitol (1 mM) cuando se agrega Cd^{2+} en concentración de 10 μM . Se indica el efecto de agregación producido por el Cd en las nanopartículas de oro, así como el cambio perceptible de color, señal que puede ser utilizada para detectar la presencia de este metal pesado.

Figura 7
Nanosensor colorimétrico para detección de Cd



a)



b)

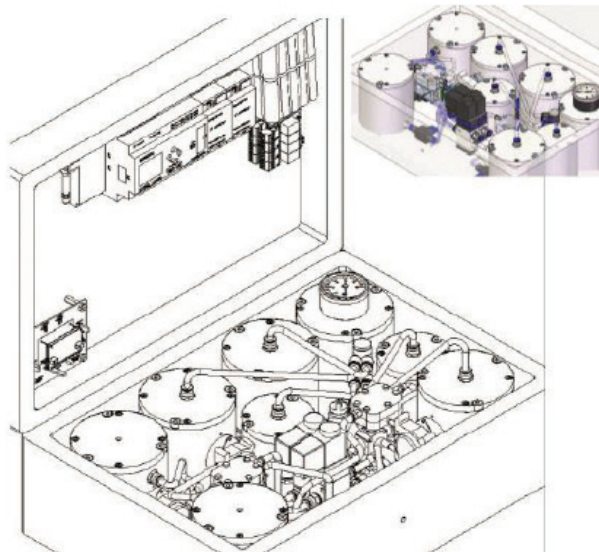
Nota. a) Corrimiento del pico de resonancia de plasmón superficial de nanopartículas de oro funcionalizadas con DDT con la adición de Cd²⁺. b) Cambio de color observado por la agregación de las nanopartículas coloidales. Se muestra registro en microscopía electrónica de transmisión antes y después de la adición del Cd²⁺. *Fuente:* Reproducidas con permiso de nanoCiTec. Equipo investigador

Los sensores de plasmón superficial ocupan una posición privilegiada en cuanto a sensibilidad y precisión. En una configuración tipo Kretschmann, un haz de luz láser polarizada incide a través de un prisma sobre una película delgada de oro funcionalizada con una monocapa molecular con capacidad para reconocimiento y fijación del agente iónico de interés. La intensidad del haz de luz reflejado de la superficie de oro depende del ángulo de reflexión de la superficie metálica de oro.

Para un cierto ángulo, se produce resonancia de plasmón; fenómeno correspondiente a una máxima oscilación de la densidad de carga eléctrica en la interfaz oro-ambiente de censado. El ángulo de resonancia depende del índice de refracción en dicho ambiente donde se encuentra fijado el agente que está siendo medido. Con este tipo de configuración y con el uso de 1,4-ditiotreitol para funcionalizar la superficie de oro. Con el grupo de Nanociencia de la PUJ se ha logrado un sistema autónomo y portable para medición de arsénico (figura 8), con registros de sensibilidad cercanos a 5 ppb (Salinas *et al.*, 2014). Este sistema de censado puede ser utilizado para medición *in situ* de Pb y Cd en cultivos de cacao, simplemente modificando la monocapa molecular de reconocimiento y fijación.

Figura 8

a) Sistema autónomo y portable para medición in situ de As que puede ser implementado para medición de Cd y Pb agricultura de cacao.



Fuente: (Salinas *et al.*, 2014).

Los nanosensores basados en agentes fluorescentes para detección y medición de Cd y Pb, consolidan una plataforma robusta para atender la problemática del cacao. Con nanoclusters de oro funcionalizados con glutatión (GSH-AuNCs) como receptor/transductor, se hace posible la agregación inducida por la presencia del Pb^{2+} (que actúa como amplificador), lo que incrementa la intensidad luminiscente de GSH-AuNCs (Ji *et al.*, 2015).

Análisis de Pb en agua con este tipo de nanosensor, mostró un comportamiento lineal, elevada selectividad y suficiente precisión y sensibilidad. Para detección de Cd en plantas, en Reyes *et al.*, (2022) se reporta el desarrollo de un sensor fluorescente para detección de Cd^{2+} en plantas de albahaca. Para tal fin, se hace uso de la respuesta fluorescente de la rodamina B con la adición de dietilenetriamina en etanol como solvente. La eficiencia en intensidad de fluorescencia obtenida permite detección *in situ* del agente de interés, en este caso Cd^{2+} . Esta propuesta de censado puede ser implementada para Cd en plantas de cacao y sus frutos.

No cabe duda que la emergencia tecnológica nanoescalar va a jugar un papel fundamental en la configuración del mapa de ruta para la modernización de la agricultura para el siglo XXI. Se hará viable a corto plazo el desarrollo y disponibilidad comercial de nanosensores de bajo costo, portables y de suficiente precisión y sensibilidad, así como una mayor apertura a las nuevas estrategias de fertilización y control de plagas, basadas en nanofertilizantes y nanoplaguicidas con capacidad de entrega selectiva y controlada.

Con un uso responsable de estas tecnologías disruptivas, la agricultura de precisión transitará hacia una meseta estable de productividad agrícola, con notables mejoras en la calidad y seguridad de los productos derivados.

REFERENCIAS

Abt, E., Sam, J., Gray, P., Robin, L. (2018). Cadmium and Lead in Cocoa Powder and Chocolate Products in the U.S. Market, *Food Additives & Contaminants: Part B*, DOI: 10.1080/19393210.2017.1420700.

Aguirre, S., Piraneque, N., Vásquez, J. (2020). Heavy metals content in soils and cocoa tissues in Magdalena department Colombia: emphasis in cadmium. *Entramado*, 16(2), 298-310. DOI: 10.18041/1900-3803/entramado.2.6753

Assa, A., Noor, A., Yunus. M., Misnawi., Djide, M. (2018) Heavy metal concentrations in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) originating from East Luwu, South Sulawesi, Indonesia, *Journal of Physics: Conf. Series*, 979, 012011. DOI: 10.1088/1742-6596/979/1/012011

Borrero, A. (2009). Fertilización del cultivo de cacao en sitio definitivo, consultado en abril 2022. Recuperado de http://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/FERTILIZACION_DEL_CULTIVO_DE_CACAO_EN_SITIO_DEFINITIVO.pdf

Chavez, E., He, Z., Stoffella, P., Mylavarapu, R., Li, Y. *et al.*, (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 533, 205-214. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.106

Corradini, E., de Moura, M. R., & Mattoso, L. H. C. (2010). A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polymer Letters*, 4(8), 509–515. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2010.64

Dahiya, S., Karpe, K., Hedge, A., Sharma, R. (2005). Lead, cadmium, and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai India, *J. Food Composition and Analysis*, 18 (6), 517-522. DOI:10.1016/j.jfca.2004.05.002

Duhan, J., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., Duhan, S. (2017). Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture, *Biotech, Rep.* 15, 11-23. DOI:10.1016/j.btre.2017.03.002

Humanní, H., Huauya, M., Mansila, L., Florida, N., Neira, G. (2012). Presencia de metales pesados en cultivos de cacao (*Theobroma cacao L.*) orgánico. *Acta Agronómica*, 61(4), 339-344. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169926831006>

ICCO (2022). Production of Cocoa Beans, *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, Cocoa year 2021/22, XLVIII(1). Disponible en: <https://www.icco.org/november-2022-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics/>

IMPOFOS (2007). Deficiencias nutricionales y fertilización de cacao. Consultado en mayo 2022 <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/cacao-fertilizacion-t27099.htm>

González, E. (2022). Tecnologías Convergentes: Selección y Adopción. *Revista Nómadas*, 55, 75-93. DOI:10.30578/nomadas.n55a5

González, E., Acuña, Y., Quiroz, A. (2022). Nanopartículas de oro funcionalizadas con L-cisteína para detección de arsénico en agua. Aceptado para publicación en *Rev. Ing. Inv. Des.* 21, 66-72. DOI: 10.19053/1900771X.v21.n2.2021.14271

Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., González, V. *et al.*, (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras, *Science of the Total Environment*, 612, 370-378. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.145

Ji, L., Guo, Y., Hong, S., Wang, Z. *et al.*, (2015) Label-free detection of Pb²⁺ based on aggregation-induced emission enhancement of Au-nanoclusters. *RSC Adv.* 5, 36582–36586. DOI: 10.1039/C5RA03449C

Kataoka, S., Watanabe, T., Hayashi, K., Akiyama, H. Surveillance of Cadmium Concentration in Chocolate and Cocoa Powder Products Distributed in Japan, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 59(6), 269-274. DOI: 10.3358/shokueishi.59.269.

Kumar, V., Guleria, P., Ranjan, S. And Dasgupta, E. (Eds). (2021) *Nanosensors for environment, food and agriculture*, Vol. 1 y 2, Springer Nature, Switzerland AG.

Mohamed, R., Zainudin, B., Yaakob, A. (2020). Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Food Chemistry*, 303, 125392. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125392

Mounicou, S., Szpunar, J., Andrey, D., Blake, C., Lobinski, R. (2002). Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products, *Food Additives & Contaminants*, 20(4), 343-352. DOI: 10.1080/0265203031000077888

Ozbek, O., Isildak, O., Burcu, M., Berkel, C. (2020). Cadmium(II)-selective potentiometric sensor based on synthesised (E)-2-Benzylidenehydrazine carbothioamide for the determination of Cd²⁺ in different environmental samples, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, DOI: 10.1080/03067319.2020.1817427.

Ramptahal, G., Yen, I., Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L. *et al.*, (2016). Relationship between cadmium in Tissues of Cacao Trees and Soils in Plantations of Trinidad and Tobago. *Food and Nutrition Sciences*, 7, 37-43. DOI: 10.4236/fns.2016.71005

Rankin, C., Nriagu, J., Aggarwal, J., Warowolo, T., Adebayo, K., Flegal, A. (2005). Lead Contamination in Cocoa and Cocoa Products: Isotopic Evidence of Global Contamination, *Environ Health Perspect.* 113(10), 1344-1348. DOI: 10.1289/ehp.8009

Reyes, Y., Rouf, T., Torres, O., González, E. (2022). Fluorescent Molecular Sensor for the Detection of Cadmium in Basil Roots, *ACS Agriculture Science & Technology*, 2, 144-152. DOI: 10.1021/acsagscitech.1c00250

Rosales, J., Cajacuri, J., Breña, J. (2021). Identificación de Cadmio y Plomo en los cultivos de cacao ubicados en la zona de Satipo – Junín, *Tecnia*, 31(2), 83-89. DOI: 10.21754/tecnica.v21i2.1062

Salinas, S., Mosquera, N., Yate, L., Coy, E., Yamhure, G., González, E. (2014). Surface Plasmon Resonance Nanosensor for the Detection of Arsenic in Water, *Sensors & Transducers*, 183(12), 97-102.

Song, N., Wang, F., Ma, Y., Tang, S. (2015). Using DGT to assess cadmium bioavailability to ryegrass as influenced by soil properties, *Pedosphere*, 25(6), 825-833. DOI:10.1016/S1002-0160(15)30063-1

Tomaszewska, M., Jarosiewicz, A. (2006). Encapsulation of mineral fertilizer by polysulfone using a spraying method, *Desalination*, 198, 345-352. DOI:10.1016/j.desal.2006.01.032

Wade, J., Ac-Pangan, M., Favoretto, V., Taylor, A., Engeseth, N., Margenot, A. (2022). Drivers of cadmium accumulation in *Theobroma cacao L.* beans: A quantitative synthesis of soil-plant relationships across the Cacao Belt, *Plos One*, 17(2), e0261989. DOI: 10.1371/journal.pone.0261989

Zug, K., Huamani, H., Meyberg, F., Cierjacks, J. Cierjacks, A. (2019). Camium Accumulation in Peruvian Cacao (*Theobroma cacao L.*) and Opportunities for mitigation. *Water Air Soil Pollut*, 230, 72. DOI:10.1007/s11270-019-4109-x



CAPÍTULO VI

**Control Bio-Nano-Tecnológico de
Monilophthora royeri usando
nanopartículas de plata**





Control Bio-Nano-Tecnológico de *Moniliophthora roreri* usando nanopartículas de plata

Raquel Amanda Villamizar Gallardo

*Grupo de Investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible, Universidad de Pamplona,
campus Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. raqvillamizar@unipamplona.edu.co*

1. Introducción

Desde su surgimiento, la Nanotecnología ha aportado nuevas alternativas de solución y/o mitigación a grandes problemáticas en diferentes sectores. En este capítulo se centra la atención específicamente en el sector agrícola cacaotero. En la actualidad, se dispone en el mercado de productos que emplean nanomateriales para diferentes aplicaciones tales como fertilizantes, biosensores, remediadores, pesticidas entre otros (Chaud *et al.*, 2021).

Entre la diversidad de nanomateriales con actividad antifúngica se destacan las nanopartículas de plata (AgNP), las cuales debido a su alta relación de superficie-volumen, exhiben propiedades únicas que incrementan su reactividad y actividad bioquímica (Khan *et al.*, 2019). Se han reportado diversas estrategias o mecanismos de acción de las AgNPs sobre hongos

fitopatógenos, las cuales en su mayoría se caracterizan por causar afectaciones a nivel de pared y membrana celular, dañando los componentes intracelulares, material genético y enzimas, y activando mecanismos de estrés oxidativo (Salem & Fouda, 2021). Las alteraciones a nivel de pared celular se producen cuando las AgNP se unen mediante interacciones electrostáticas a grupos cargados positivamente como glucanos, generando así alteraciones morfológicas que permiten la salida de los componentes intracelulares, lo cual afecta la integridad de la célula, ocasionando la muerte. Además, las AgNP también pueden influir en procesos celulares de gran importancia, como lo es la respiración celular, la replicación del material genético y la división celular (Ali *et al.*, 2020).

En el contexto internacional, son varios los investigadores que han reportado la actividad inhibitoria de AgNP, contra un amplio espectro de hongos fitopatógenos en el sector de la agricultura (Mansoor *et al.*, 2021). A nivel nacional, en busca de nuevas estrategias para el control de fitopatógenos en cultivos de cacao, Villamizar y colaboradores, realizaron una investigación para evaluar la capacidad antifúngica de nanopartículas de plata obtenidas por síntesis química frente a *Aspergillus niger* y *Fusarium solani*, aislados de cultivos de cacao en fincas del departamento Norte de Santander. Los investigadores demostraron que estos nanomateriales tuvieron un efecto inhibitorio contra los fitopatógenos entre 50 ppm y 80 ppm, logrando una reducción y/o inhibición en la corteza de cacao (Villamizar *et al.*, 2017).

No obstante, el uso de AgNP obtenidas por síntesis física o química, representa un problema desde el punto de vista ambiental ya que su producción es altamente contaminante, ya sea por la energía que requiere o por los subproductos que generan tras la síntesis.

En este sentido, investigadores han buscado estrategias más amigables con el ambiente, a través de métodos biológicos los cuales son altamente efectivos y eco-amigables. Lateef y colaboradores, publicaron una investigación sobre la utilidad del extracto de la vaina del cacao cáscara para la síntesis de AgNP. Las partículas sintetizadas mostraron morfología esférica, con un tamaño que osciló desde 4 a 32 nm y mostraron antifúngica frente a diferentes especies de *Aspergillus* sp. inhibiendo completamente su crecimiento (Lateef *et al.*, 2016).

En 2022 Campo y colaboradores, reportaron el uso de nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biotecnológica a partir del hongo fitopatógeno *Aspergillus flavus*, aislado a partir de cultivos de cacao en el departamento Norte de Santander, como agente bactericida de cepas multiresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*. Los autores demostraron que las soluciones coloidales fueron capaces de producir daño a nivel de membrana celular, pared celular, además de generar especies reactivas del oxígeno (ROS) que afectaron la viabilidad de la bacteria (Campo *et al.*, 2022).

Tomando en cuenta los antecedentes previamente mencionados, se exploró la posibilidad de introducir algunos principios de la economía circular para darle un valor añadido al enfoque Bio-Nano-Tecnológico, que se viene empleando en nuestras investigaciones. Para tal fin, se usaron cacotas de cacao como material biológico para la obtención del agente reductor, requerido para sintetizar AgNP por biorreducción y a su vez, se evaluó la capacidad inhibitoria de estos nanomateriales sobre *Moniliophthora roreri*, autóctono del mismo cultivo.

2. Metodología

2.1. Obtención del hongo patógeno

Moniliophthora roreri fue provista por el Laboratorio de Nanotecnología y Gestión Sostenible de la Universidad de Pamplona, quienes reportaron su aislamiento e identificación a partir de mazorcas de cacao enfermas, provenientes de diferentes fincas cacaoteras del departamento Norte de Santander (Villamizar *et al.*, 2019).

2.2. Biosíntesis de AgNPs usando cáscara de cacao

Se empleó la metodología de Lateef y colaboradores con algunas modificaciones. Se recolectaron frutos frescos de cacao de una finca localizada en el municipio de Bochalema, en el departamento Norte de Santander, cuya temperatura se encuentra en un rango de 22°C a 30°C con una media anual de 28.6°C; precipitación media anual de 1.969,6 mm que la clasifica como bosque tropical húmedo. Suelos predominantes con textura arenosa, con pH de 4,9. Las cacotas se llevaron al laboratorio y se lavaron con detergente

para eliminar residuos y otras sustancias extrañas. Se dividieron por la mitad y se separó la cáscara del fruto contenido en el interior. Se tomó solo la corteza y se cortó en cuadros pequeños, los cuales se secaron a temperatura ambiente durante 7 días.

Los chips de cáscara se molieron hasta obtener un macerado con la ayuda de una batidora eléctrica. Posteriormente, se pesaron 0,1 g del macerado y se suspendieron en 10 mL de agua destilada. Luego, se calentó la suspensión a 60 °C durante 1 h. El extracto se filtró usando filtro Whatman No. 1 y después se centrifugó a 4000 rpm. El sobrenadante fue colectada y almacenada a 4°C para su uso posterior. Finalmente, a 40 mL de nitrato de plata (AgNO₃) (Sigma-Aldrich) 1 mM, se le adicionó 1 mL del extracto obtenido en el paso anterior. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante algunos minutos, hasta observar un cambio en el color (Lateef, *et al.*, 2016).

2.3. Caracterización UV-Vis de las AgNPs

En un tubo Eppendorf se adicionaron 2 ml de la solución coloidal obtenida y fue llevado a un sonicador por 10 minutos. Seguidamente, la muestra se introdujo en celda de cuarzo y se midió en espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu) para observar el pico de absorbancia generada en un rango de longitud de onda entre 350 y 700 nm. En el detector UV-VIS, la señal medida depende de la absorción y dispersión de radiación el cual, a su vez, es dependiente del tamaño de las nanopartículas y de la longitud de onda de la luz.

2.4. Preparación diluciones de las AgNPs

Se prepararon patrones de las nanopartículas realizando diluciones hasta tener concentraciones de 100 % - 90 % - 80 % - 70 % - 60 % - 50 %, empleando agua destilada como solvente.

2.5. Ensayos de inhibición con AgNPs en medios de cultivo

El ensayo *in vitro* se realizó en agar PDA modificado con extracto de cacao, sobre el cual se adicionó 5 mL de las AgNPs sintetizadas y se dejó secar durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, se depositaron en el centro de

las cajas, discos de 8 mm de diámetro conteniendo agar PDA con el crecimiento de 8 días del patógeno *Moniliophthora roreri*. Las cajas de Petri se incubaron a 25 ° C/14 días. Como control positivo se emplearon cajas de Petri con los respectivos medios inoculados con el patógeno y sin la nanopartícula (Adaptada por Nasrollahi *et al.*, 2011). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.6. Ensayos de inhibición con AgNPs en planta

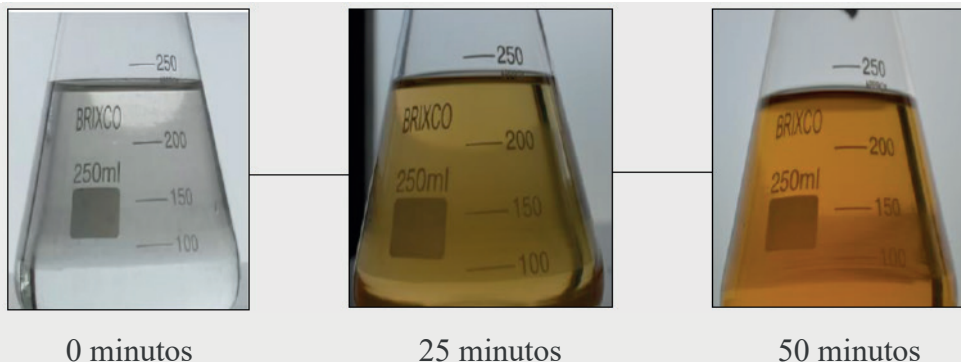
Se emplearon placas estériles con 24 pocillos con tapa TC (Cellstar, Sigma Aldrich, EE.UU.) en cada una de las cuales se colocaron trozos pequeños de 0.5*0.5 cm de corteza y pulpa de cacao previamente esterilizados bajo tratamiento con calor húmedo (121°C/15 lb de presión/ 20 min). Seguidamente cada trozo fue modificado con la solución coloidal de AgNPs a diferentes concentraciones (100 % - 90 % – 80 % – 70 % – 60 % – 50 %,) y se contaminaron artificialmente con 100 µL que contenían 3*10⁶ *Moniliophthora roreri*. Las placas se incubaron a 25°C/18 días. Como control positivo se inocularon los trozos de cacota sólo con el patógeno, mientras que para el control negativo se dejaron solo los trozos de cacota con AgNP. El efecto inhibitor fue observado macroscópicamente y se evaluó en función del crecimiento o ausencia aparente del hongo sobre la corteza o la pulpa de cacao (Villamizar *et al.*, 2016).

3. Resultados

El extracto de la cáscara de cacao sirvió como agente para la bioreducción del sustrato (AgNO₃) hasta la formación de las nanopartículas, en un tiempo de 50 minutos. La solución coloidal se mantuvo estable sin formación de precipitado aparente durante al menos 25 días (Figura 1).

Figura 1

Síntesis de nanopartículas de plata por biorreducción usando extracto de cacota

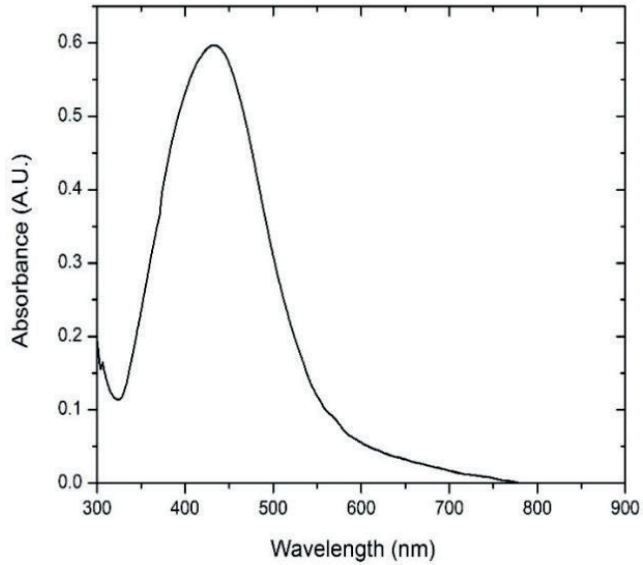


Nota. Se evidencia el cambio de coloración de la suspensión, transcurridos 25 minutos de reacción de la solución de corteza con AgNO_3 a una concentración 1 mM. *Fuente:* Equipo investigador

Para confirmar la reacción colorimétrica, se procedió a caracterizar mediante espectro UVVis. La formación de AgNP se evidenció por un pico de absorbancia a 420 nm (Figura 2), longitud de onda a la cual ocurre un fenómeno denominado “Resonancia de Plasmón” (Villamizar, 2022). Estos fenómenos son oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos. Para que esto ocurra, el tamaño de la nanopartícula debe ser menor que la longitud de onda de la luz incidente. La resonancia de estos plasmones superficiales justifica la aparición de bandas de absorción y en el caso de metales nobles como la Ag, la resonancia es máxima y provoca la aparición de bandas en la región del visible (Cruz *et al.*, 2012).

Figura 2

Espectro UV-Vis de la solución coloidal de nanopartículas de plata obtenidas usando extracto de cacao como agente reductor

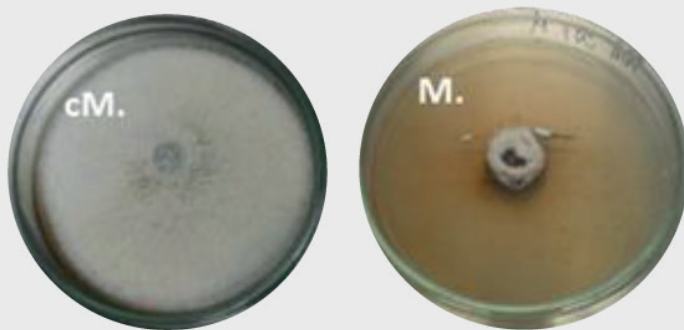


Fuente: Equipo investigador

Los resultados obtenidos usando medios de cultivo modificados con AgNP permitieron determinar que estos nanomateriales redujeron el crecimiento del patógeno de manera significativa con respecto al control. Se pudo apreciar cómo se detuvo el crecimiento de *M. roreri* durante los días de ensayo (Figura 3).

Figura 3

*Ensayo de difusión en medio PDA donde cM) Crecimiento control de *M. roreri* y M) Crecimiento de *M. roreri* en agar PDA modificado con AgNP 100%*



Fuente: Equipo investigador

Dado que el hongo logró crecer ligeramente en medio, se procedió a medir el crecimiento micelial del mismo comparándolo con un tratamiento control (sin nanopartículas), para hallar la velocidad máxima de crecimiento (Vmax). Los resultados se aprecian en la siguiente tabla 1. Se encontró que la velocidad de crecimiento fue menor en los medios con nanopartículas que en el control, lo cual confirmó el efecto inhibitorio del nanomaterial sobre el patógeno.

Tabla 1

Velocidad de crecimiento máxima de M. roreri bajo tratamiento con AgNP en agar PDA modificado con extracto de cacao.

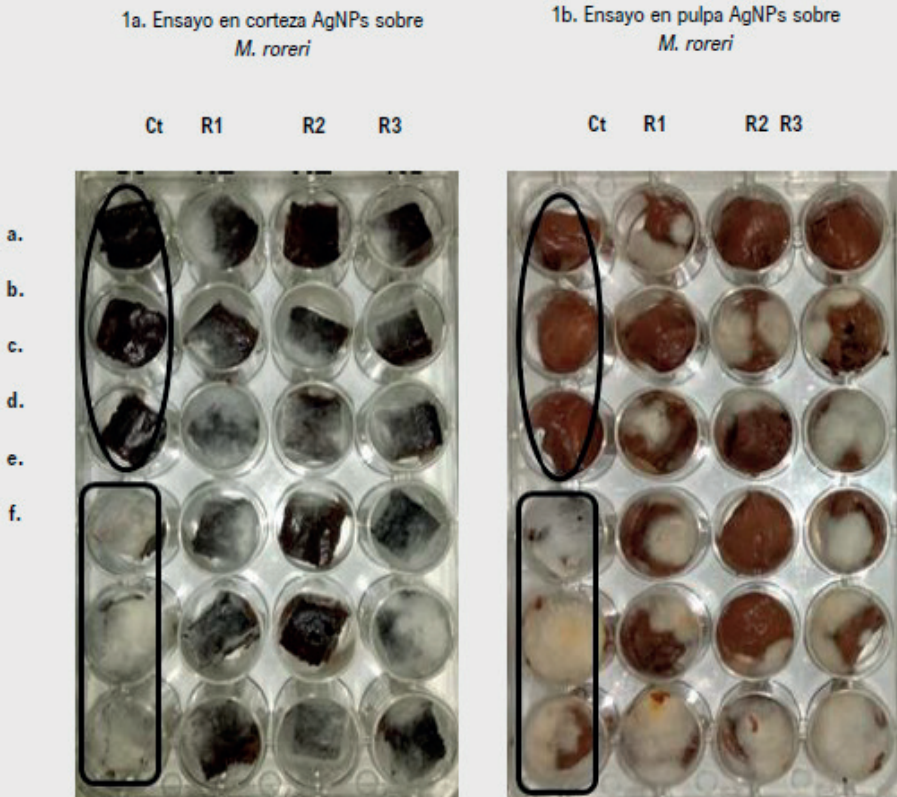
Fitopatógeno	Medio	VEL MAX (mm/día) (AgNPs)	VEL MAX (mm/día)(Control)
<i>M. roreri</i>	PDA	0.168 ± 0.0208 ^{aA}	0.425 ± 0.0680 ^{Ba}

Nota. Las columnas con letras minúsculas en común, indica la no existencia de diferencias significativas en la velocidad de crecimiento con un valor p. *Fuente:* Equipo investigador

Para confirmar si este mismo comportamiento se observaba *in vivo*, se procedió hacer la valoración de concentraciones descendentes de AgNP directamente en trozos de corteza y pulpa de cacao. Los resultados permitieron visualizar que a 100 %, las AgNP logran una reducción del crecimiento del patógeno sin llegar a la inhibición total. No obstante, a medida que la concentración de la solución coloidal disminuyó, el efecto inhibitorio también, tanto en corteza como en pulpa de cacao permitiendo el crecimiento del patógeno en al menos dos de las tres réplicas realizadas (Figura 4).

Figura 4

Ensayo de inhibición sobre pulpa y corteza de cacao modificada con diferentes concentraciones a)100% b) 90% c) 80% d) 70% e) 60% f) 50% frente a *M. royeri*. Ct (a-c): Negativo Ct (d-f) positivo (trozo de pulpa o corteza inoculado sólo con el fitopatógeno). R1-R3 (réplicas).



Fuente: Equipo investigador

4. Discusión

La coloración de las soluciones coloidales de AgNP, está dada en función del tamaño y morfología de las nanopartículas. Un color naranja indica la presencia de nanopartículas esféricas con un rango de tamaño inferior a 50 nm. Esto, ha sido previamente reportado por Lateef y colaboradores, quienes obtuvieron partículas con morfología esférica con un tamaño que oscila entre 4 y 32 nm (Lateef, *et al.*, 2016). Aunque en este estudio no se llevó a cabo caracterización por microscopía electrónica de las AgNP, se podría

inferir que, por la coloración obtenida y el pico de absorbancia, los tamaños serían similares a los reportados por Lateef, y col, toda vez que se siguió la misma metodología para la síntesis.

Las propiedades antimicrobianas de la plata se basan en varios aspectos. Uno de ellos es su morfología y tamaño. En hongos, se ha observado, que las nanopartículas a bajas concentraciones (i.e. 10 ppm, 20 ppm) producen cambios estructurales en las hifas y a altas concentraciones (i.e 100 ppm) produce deformaciones en la pared celular, daños en la membrana, así como cambios significativos en la forma de las esporas y su germinación (Lamsal *et al.*, 2011; Kim, *et al.*, 2009; Nasrollahi *et al.*, 2011). Este hallazgo es similar al obtenido en esta investigación, donde se logró apreciar cambios en la tasa de germinación de *Moniliophthora roreri* con una reducción significativa en la velocidad de crecimiento en medio de cultivo con respecto al control. Además, se apreció cambio en la pigmentación del hongo, especialmente en los ensayos realizados *in vivo*.

5. Conclusiones

Las nanopartículas de plata obtenidas por biorreducción, se podrían convertir en una alternativa eco-amigable y costo-efectiva para el control del crecimiento de patógenos en los cultivos de cacao en la región. No obstante, se requieren estudios más profundos sobre su mecanismo de acción, fitotoxicidad, así como la posible adición de grupos funcionales a su superficie que permitan potenciar su acción inhibitoria, previo escalado y aplicación en campo. Esta proyección está siendo evaluada en este momento por un estudiante de maestría y se espera en poco tiempo poder comunicar los hallazgos que se han alcanzado.

REFERENCIAS

Ali, M. A., Ahmed, T., Wu, W., Hossain, A., Hafeez, R., Masum, M. M. I., Wang, Y., An, Q., Sun, G., & Li, B. (2020). Advancements in plant and microbe-based synthesis of metallic nanoparticles and their antimicrobial activity against plant pathogens. *Nanomaterials*, 10(6): 1–24. DOI: 10.3390/nano10061146

Campo, B., Villamizar, R., López-Jácome, L.E., González, E.E., Muñoz-Carranza, S., Franco, B., Morales-Espinosa, R., Coria-Jimenez, R., Franco-Cendejas, R., Hernández-Durán, M., Lara-Martínez, R., Jiménez-García, L.F., Fernández-Prezas, A.M., García-Contreras, R. (2022). Biologically synthesized silver nanoparticles as potent antibacterial effective against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol*, 75(3):680-688. DOI: 10.1111/lam.13759

Chaud M, Souto EB, Zielinska A, Severino P, Batain F, Oliveira-Junior J, Alves T. (2021). Nanopesticides in Agriculture: Benefits and Challenge in Agricultural Productivity, Toxicological Risks to Human Health and Environment. *Toxics*, 9(6): 131. DOI: 10.3390/toxics9060131

Cruz, D., Rodríguez, M., López, J., Herrera, V., Orive, A., Creus, A. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67-78. Recuperado de <https://www.redalyc.org/como-citar.oa?id=323627686007>

Khan, S. A. (2020). Metal nanoparticles toxicity: role of physicochemical aspects. In *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications* (pp. 1–12). Elsevier Inc.

Kim, S. W., Jung, J. H., Lamsal, K., Kim, Y. S., Min, J. S., & Lee, Y. S. (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40(1), 53–58. doi: 10.5941/MYCO.2012.40.1.053

Lamsal, K., Kim, S.W., Jung, J.H., Kim, Y.S., Kim, K.S., Lee, Y.S. (2011). Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species *in vitro* and pepper anthracnose disease in field. *Mycobiology*, 39:194-199. DOI: 10.5941/MYCO.2011.39.3.194

- Lateef, A., Azeez, M.A., Asafa, T.B. *et al.*, Cocoa pod husk extract-mediated biosynthesis of silver nanoparticles: its antimicrobial, antioxidant and larvicidal activities. *J Nanostruct Chem* 6, 159–169 (2016). <https://doi.org/10.1007/s40097-016-0191-4>
- Mansoor, S., Zahoor, I., Baba, T. R., Padder, S.A., Bhat, Z.A., Koul, A. M., Jiang, L. (2021). Fabrication of Silver Nanoparticles Against Fungal Pathogens. *Frontiers in Nanotechnology*. 3: 679358 <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.679358>
- Nasrollahi, A., Pourshamsian, Kh., Mansourkiaee, P. (2011). Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *International Journal of Nano Dimension*, 1(3): 233-239. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.988633>
- Rueda, P.E., Rueda, J.E., Villamizar, R.A. (2022). Detección de Kerr óptico en nanofluidos basados en nanopartículas de Ag obtenidas por biosíntesis con hongos endofíticos de la mazorca de cacao. *Optica Pura y Aplicada*, 55(1): 51064. DOI: 10.7149/OPA.55.1.51064
- Salem, S. S., & Fouda, A. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biological Trace Element Research*, 2021. 199(1): 344–370. DOI: 10.1007/s12011-020-02138-3
- Villamizar-Gallardo, R. A., Ortíz-Rodríguez, O. O., & Escobar, J. W. (2017). Symbiotic and endophytic fungi as biocontrols against cocoa (*Theobroma cacao* L.) phytopathogens. *Summa Phytopathologica*, 43(2), 87–93. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2175>
- Villamizar-Gallardo, R., Cruz, J. F. O., & Ortíz, O. O. (2016). Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 51(12), 1929–1936. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016001200003>
- Villamizar, R. (2016). Biotechnological Synthesis of Silver Nanoparticles using Phytopathogenic Fungi and their Microbicidal Effect. In E. y N. Academia de Ciencias Físicas (Ed.), *BIO-NANOTECHNOLOGY for sustainable Environmental Remediation and Energy Production*. pp. 123–13
- Villamizar-Gallardo, R., Osma, J. F., & Ortíz-Rodríguez, O. O. (2019). Regional evaluation of fungal pathogen incidence in colombian cocoa crops. *Agriculture (Switzerland)*, 9(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/agriculture9030044>

A detailed botanical illustration in gold and white. The central focus is a large, open seed pod, likely from a legume, showing two rows of oval-shaped seeds. The pod is attached to a stem with several large, deeply lobed leaves. The leaves have prominent veins and are shown in various orientations, some overlapping. The background is a light, textured grey. The overall style is that of a fine-line drawing or engraving.

GALERÍA FOTOGRAFICA



●
*Visitas de campo
Finca El Amparo,
N de S., con el
soporte técnico
de Jorge Duque,
técnico de
Fedecacao*



●
*Brotes florales
de cacao*

Fuente: Equipo investigador





●
*Pepinos
de cacao*



●
*Toma de
variables de
frutos en
campo*

Fuente: Equipo investigador



Charlas de capacitación a técnicos, cacaocultores y empresarios de la Federación de Cacaoteros de Norte de Santander.



Fuente: Equipo investigador

Socialización de resultados en eventos científicos

IV Congreso Nacional en Investigación
e Innovación en Ciencia y Tecnología de los
Alimentos (IICTA) Cali, Colombia, 2018.



Fuente: Equipo investigador



Socialización de resultados en eventos científicos
Congreso de Gestión Ambiental, La Habana, Cuba, 2019.

Fuente: Equipo investigador

Cartilla educativa: Cacao, más allá del chocolate.

Disponible en: https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portalIG/home_206/recursos/general/27052022/cartillakk.pdf



Fuente: Equipo investigador



Biotechnological Synthesis of Silver Nanoparticles using Phytopathogenic Fungi and their Microbicidal Effect

Raquel Villamizar

*The objective of this research was to explore the ability of native fungi isolated from cocoa crops at the departement Norte de Santander, Colombia, to biosynthesize nanomaterials. Once standardized, the nanoparticles were characterized by using techniques such as UV-Vis spectrophotometry and scanning electron microscopy. Finally, the microbicide effect on pathogens of clinical and agro-food interest was evaluated. As for their microbicidal capacity, it was observed a strong inhibition effect on the yeast *Candida albicans*. In the case of tested bacteria, AgNP were more effective against Gram negative (i.e. *E.coli*) than Gram Positive (*S. aureus*).*

Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología. Grupo de Investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible (NANOSOST).

Km. 1 Via Bucaramanga, Pamplona Norte de Santander-Colombia.

E-mail: raqvillamizar@unipamplona.edu.co

Capítulo de libro

Publicado en el libro: Bio-Nanotecnology for Sustainable Environmental Remediation and Energy Production, ISBN 978- 958-9205-90-7, el cual fue editado por la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2016.



Open Access Article

Regional Evaluation of Fungal Pathogen Incidence in Colombian Cocoa Crops

by Raquel Villamizar-Gallardo ^{1*}, Johann F. Osma ² and Oscar Orlando Ortiz-Rodriguez ³

¹ Interdisciplinary Laboratory of Nanotechnology and Sustainable Management, NANOSOST-UP, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Universidad de Pamplona, Km 1 vía Bucaramanga, Pamplona 543050, Colombia

² CMUA, Department of Electrical and Electronic Engineering, Universidad de los Andes, Cra. 1E # 19A-40, Bogota 1100111, Colombia

³ Department of Industrial Engineering, School of Engineering and Architecture, Universidad de Pamplona, Km 1, vía Bucaramanga, Pamplona 543050, Colombia

* Author to whom correspondence should be addressed.

Agriculture 2019, 9(3), 44; <https://doi.org/10.3390/agriculture9030044>

Received: 17 July 2018 / Revised: 27 November 2018 / Accepted: 11 December 2018 / Published: 4 March 2019

(This article belongs to the Special Issue Plant-Microbe Interactions)

View Full-Text

Download PDF

Browse Figures

Citation Export

Disponibile en: <https://www.mdpi.com/2077-0472/9/3/44>

ARTICLES • Summa Phytopathol. 43 (2) • Apr-Jun 2017 • <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2175> COPY

Este documento tiene una errata:
» [10.1590/0100-5405/2175A](https://doi.org/10.1590/0100-5405/2175A)

Symbiotic and endophytic fungi as biocontrols against cocoa (*Theobroma cacao* L.) phytopathogens

Relação entre gene e resistência *Rps 1k* com resistência a *Pythium ultimum* e *P. irregulare* em soja

Raquel Amanda Villamizar-Gallardo Oscar Orlando Ortiz-Rodriguez Jhon Wilmer Escobar ABOUT THE AUTHORS

- » ABSTRACT
- » RESUMO
- » Text
- MATERIALS AND METHO...
- RESULTS AND DISCUS...
- » ACKNOWLEDGMENTS
- » REFERENCES
- » Publication Dates
- » History

ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a tropical tree, seriously affected by fungal diseases. To control several pathogens, biological methods are prescribed since they are friendly to the environment and easy to use. The main objective of this study was to assess the biocontrol effect of two native strains, *Trichoderma viride* and *Botryosphaeria quercum*, on phytopathogens such as *Phytophthora palmiورا* and *Monilophthora rareni*, causal agents of black pod and frosty pod rot diseases, respectively. In addition, biocontrolers were faced on potential mycotogenic fungi such as *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*, which are very common on cocoa. The Bio-Control Index (BCI) was calculated to determine the *in vitro* biocontrol effect against the four phytopathogens. Results indicated that the best biocontrol agent of phytopathogens was *B. quercum*, showing BCI of 82.3%, 80.7%, 63.3% and 59.7% for each tested phytopathogen, respectively. Competition for substrate was the dominant biocontrol strategy. As to the origin of strains, those coming from the Department Norte de Santander and Santander showed the highest average inhibition percentage. This study provides an initial screening to the endophytic and antagonistic potential of fungi, specifically those capable of colonizing cocoa pods and soils. Thus, these strains can be used as an

Disponibile en: <https://www.scielo.br/j/sp/a/qjDKmMF8r6Mr7gfnfY3TGF/?lang=en>



Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in COCOA

Efeito fungicida de nanopartículas de prata em fungos toxigênicos em cacauero

Raquel Villamizar-Gallardo Johann Faccelo Osma Cruz Oscar Orlando Ortiz-Rodriguez [ABOUT THE AUTHORS](#)

- » Abstract
- » Resumo:
- » Text
 - Introduction
 - Materials and Methods
 - Results and Discussion
 - Conclusions
 - » Acknowledgments
 - » References
 - » Publication Dates
 - » History

Abstract:

The objective of this work was to evaluate the microbicidal effect of silver nanoparticles (AgNPs) on potentially toxigenic fungi affecting cocoa (*Theobroma cacao*) crops. These fungi, isolated from diseased cocoa pods, were characterized phenotypically and genotypically. The microbicidal effect was assessed by measuring radial mycelial growth, in synthetic culture media, and at different AgNP concentrations in plant tissues. The inhibition effect was monitored in Petri dishes, and changes in fungal structures were observed through scanning electron microscopy. Two potentially toxigenic fungi were highly prevalent: *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. The inhibition assays, performed in liquid and solid synthetic culture media, showed that AgNPs did not significantly affect the growth of these fungi, even at the highest concentration (100 ppm). By contrast, they showed a positive inhibitory effect in plant tissues, especially in the cortex, when infected with *A. flavus*, in which an 80 ppm dose completely inhibited fungal growth. However, once fungi have managed to penetrate inside the pods, their growth is unavoidable, and AgNP effect is reduced. On

F. solani, the studied nanomaterial only induced some texture and pigmentation changes. The microbicidal effect of chemically synthesized silver nanoparticles is greater in plant tissues than in culture media.

Index terms:

Aspergillus flavus; *Fusarium solani*; *Theobroma cacao*; alternative control; agri-food nanotechnology; ochratoxin A

Disponible en: <https://www.scielo.br/j/sp/a/qjDKmMF8r6Mr7gfncfY3TGF/?lang=en>

Agrociencia

versión On-line ISSN 2521-9766 versión impresa ISSN 1405-3195

Resumen

MARTINEZ-ANGEL, J. Daniel; VILLAMIZAR-GALLARDO, R. Amanda y ORTIZ-RODRIGUEZ, O. Orlando. Characterization and evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk as a renewable energy source. *Agrociencia* [online]. 2015, vol.49, n.3, pp.329-345. ISSN 2521-9766.

In Colombia, the cocoa pod husk (CPH) is expected to reach 2 100 000 t year⁻¹ in 2021 which is usually burned or left over for decomposing outdoors at the plantations without any environmental control. Therefore, this study evaluated the energetic potential of CPH obtained after the initial processing of this fruit (*Theobroma cacao* L.). Three biological materials were analyzed: clone CCN-51 (CPH₁), clone ICS-39 (CPH₂) and a hybrid (CPH₃), which present high yield and number of fruits per tree. The samples were examined by using different characterization techniques for raw biomass and ashes; in addition to the ultimate, proximate and heating value analyses, different fouling indexes were determined in order to estimate the phenomena of solids formation inside the reactor when combustion or gasification is used as a thermochemical valorization process. The Colombian CPHs contain relatively homogeneous levels of C, H and O, but very heterogeneous ash contents (1.4 to 12.9 wt %). The three studied samples showed high content of K₂O in ashes (67 to 74 wt %). The higher heating value (HHV) ranged from 15 395 to 16 670 kJ kg⁻¹. Furthermore, the fouling index and the fusibility analysis suggest the appearance of agglomeration and sintering phenomena when CPH is used as a fuel. The gasification is proposed as the process with major possibilities for the energetic use of CPH. CPH₁ sample seems to allow a more stable and flexible operation, as compared to CPH₂ and CPH₃.

Palabras llave : Biomass; cocoa pod husk; gasification; crop residues; renewable energy systems; *Theobroma cacao* L..



- [resumen en Español](#)
- [texto en Inglés](#)
- Inglés ([pdf](#))

Servicios Personalizados


Revista

SciELO Analytics
Google Scholar H5M5 (2021)

Artículo

Inglés (pdf)
Artículo en XML
Referencias del artículo
Como citar este artículo
SciELO Analytics
 Traducción automática
 Enviar artículo por email

Indicadores

 Citado por SciELO

Accesos

Links relacionados

Similares en SciELO

Compartir

 Otros

Otros

Permalink

Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952015000300008&script=sci_abstract&tlng=en



Optical Kerr detection in nanofluids based on Ag nanoparticles obtained by biosynthesis with endophytic fungi from the cocoa pod husk

Detección de Kerr óptico en nanofluidos basados en nanopartículas de Ag obtenidas por biosíntesis con hongos endofíticos de la mazorca de cacao

P.E. Rueda¹, J.E. Rueda^{2*}, R.A. Villamizar³

1. Centro de Investigaciones Ópticas, Universidad de La Plata, Argentina

2. Grupo Óptica Moderna, Universidad de Pamplona, Colombia

3. Grupo de Investigación en Nanotecnología y Gestión Sostenible, Universidad de Pamplona, Colombia

* E-mail: jruedap2003@unipamplona.edu.co

S: miembro de SEDOPTICA / SEDOPTICA member

Received: 18/05/2021

Accepted: 11/08/2021

DOI: 10.7149/OPA.55.1.51064

ABSTRACT:

The current research shows the results obtained through the implementation of the axial scanning technique, which were applied to determine the non-linear optical response of nanofluids based on Ag nanoparticles, biosynthesized by means of endophytic fungi isolated from cocoa pod husk cultivated in Norte de Santander-Colombia.

Key words: Non-linear optics, Z-Scan spectroscopy, Non-linear refractive index, Non-linear absorption coefficient, Thermal lens, Ag Nanofluid.

RESUMEN:

La presente investigación muestra los resultados obtenidos de la implementación de la técnica de barrido axial, empleada en la determinación de la respuesta óptica no lineal de nanofluidos basados en nanopartículas de Ag, las cuales fueron biosintetizadas a través de un hongo endofítico aislado de la mazorca de cacao, cultivado en Norte de Santander - Colombia.

Palabras clave: Óptica no lineal, Espectroscopía Z-Scan, Índice de refracción no lineal, Coeficiente de absorción no lineal, Lente térmica, Nanofluido de Ag.

Disponibile en: https://sedoptica.es/Menu_Volumenes/Pdfs/OPA.55.1.51064.pdf





UNIVERSIDAD
DE PAMPLONA

ISBN: 978-628-7656-01-7



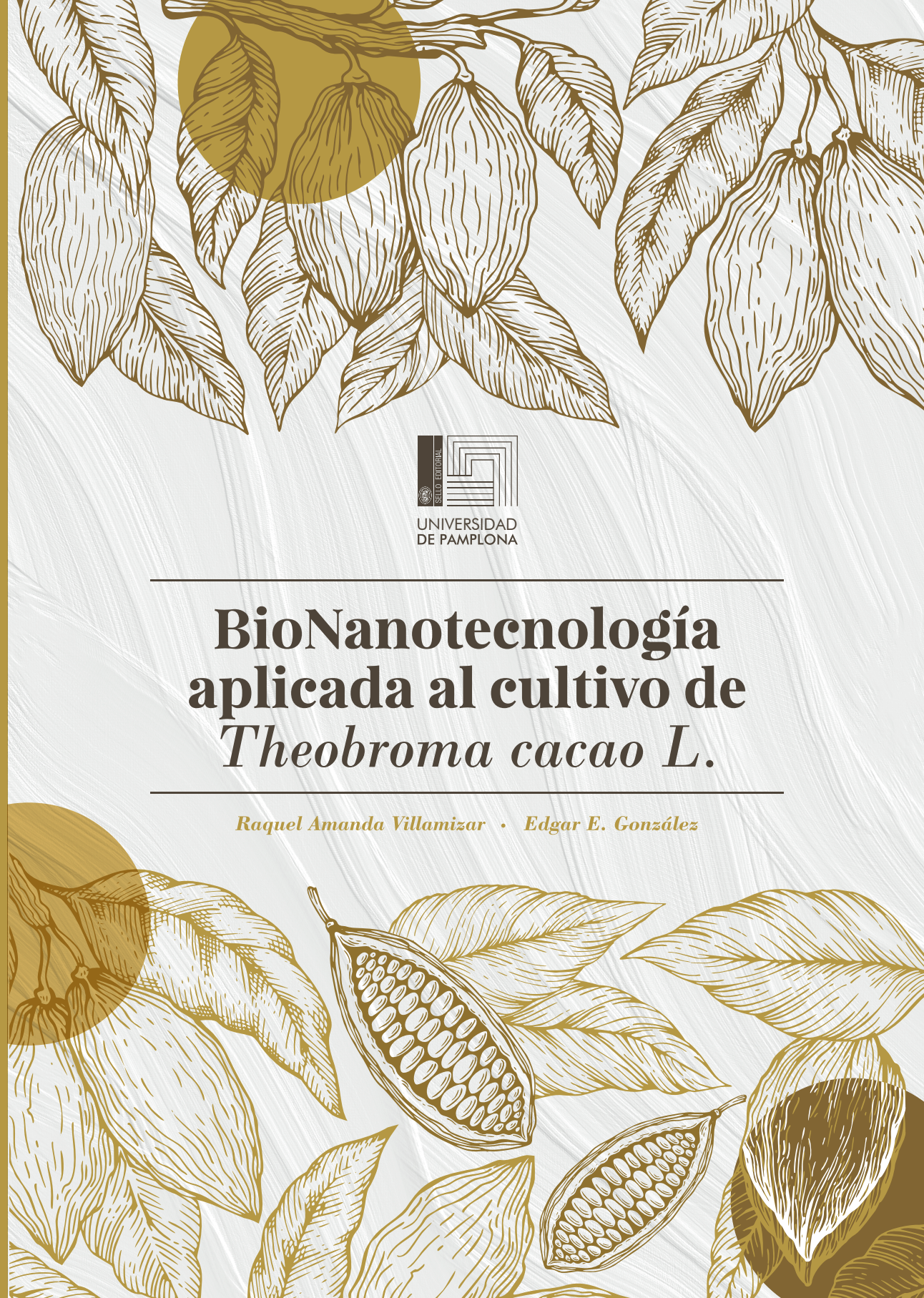
UNIVERSIDAD
DE PAMPLONA

ISBN: 978-628-7656-01-7



UNIVERSIDAD
DE PAMPLONA

*BioNanotecnología aplicada al cultivo
de Theobroma cacao L. /*



UNIVERSIDAD
DE PAMPLONA

BioNanotecnología aplicada al cultivo de *Theobroma cacao L.*

Raquel Amanda Villamizar • Edgar E. González