

**INCIDENCIA DE OCRATOXINA A Y AISLAMIENTO DE HONGOS CON
POTENCIAL OCRATOXIGÉNICO EN LAS ETAPAS DE BENEFICIO DE CAFÉ
(*Coffea arabica*) PRODUCIDO EN TOLEDO - NORTE DE SANTANDER**

HUSSEY LORDUY QUEVEDO MOJICA

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIÓLOGO**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
Pamplona, 2018.**

**INCIDENCIA DE OCRATOXINA A Y AISLAMIENTO DE HONGOS CON
POTENCIAL OCRATOXIGÉNICO EN LAS ETAPAS DE BENEFICIO DE CAFÉ
(*Coffea arabica*) PRODUCIDO EN TOLEDO - NORTE DE SANTANDER**

HUSSEY LORDUY QUEVEDO MOJICA

Directora:
MSc. LILIANA ROJAS CONTRERAS

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIÓLOGO

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
Pamplona, 2018.**

Nota de aceptación

Firma jurado

Firma jurado

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por permitirme llegar hasta este punto y haberme dado salud y la sabiduría necesaria para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres Belkis María Mojica y Dumar Hussey Quevedo por apoyarme en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han inculcado en todo momento y por el valor mostrado para salir adelante.

A mi compañera de vida Laura Vanessa Palomino, por su apoyo incondicional, su comprensión y motivación; por ser la madre de mi amado hijo Liam Andrés, quien me ha enseñado a ser una mejor persona, a saber que una pequeña sonrisa puede mover mi mundo, y sentir que todo sucede por algo.

A mis hermanos, Fabián, Yandri y Lina, por todos los momentos que hemos vivido, por estar siempre cuando los necesito y por todo el amor que aportan a mi vida, también a mis sobrinos Jhosep, Smith, Celeste, Daniel y Oscar, por ser los angelitos que llegaron a alegrar nuestras vidas.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis docentes Liliana Rojas Contreras, Ángela Cajiao y Ovidio García por su gran apoyo, su dedicación y empeño a la hora de la enseñanza, por brindarme las herramientas para ser un profesional íntegro, por la motivación dada para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de este trabajo de grado; también quiero dar gracias a cada uno de los docentes del programa por instruirme y construir peldaño a peldaño nuestros sueños y futuro.

A mi amigo Roberth Cárdenas, por su amistad incondicional por ayudarme a ser una mejor persona, por sus consejos y por la gran ayuda en la elaboración de este proyecto de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	14
<i>General</i>	14
<i>Específicos</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS	18
5. MARCO REFERENCIAL	19
5.1. MARCO TEÓRICO	19
5.1.1. Generalidades del café	19
5.1.2. Taxonomía	20
5.1.3. Composición química de la semilla del café.....	21
5.1.4. Generalidades del procesamiento del café	22
5.1.5. Beneficio del café por vía húmeda	22
5.1.6. Beneficio de café y las Buenas Prácticas de Manufactura.....	27
5.1.7. Ocratoxina A	28
5.1.8. Ocratoxina A en café.....	32
5.2. BASES LEGALES	33
5.3. ANTECEDENTES	35
6. METODOLOGÍA	40
6.1. <i>Recolección de las muestras</i>	40
6.2. <i>Determinación de Ocratoxina A</i>	40
6.3. <i>Análisis estadístico</i>	41
6.4. <i>Análisis fisicoquímico</i>	41
6.5. <i>Aislamiento fúngico direccionado a la búsqueda de especies ocratoxigénicas</i>	41
6.6. <i>Selección de cepas con potencial en la producción de OTA</i>	42
6.7. <i>Caracterización de cepas con potencial en la producción de OTA</i>	42
6.8. <i>Ensayo preliminar para el biocontrol de cepas potencialmente productoras de OTA</i>	42

6.9.	<i>Protocolo de extracción de ADN.....</i>	<i>43</i>
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
7.1.	<i>Determinación de la incidencia de OTA en las etapas de beneficio del café. 45</i>	
7.2.	<i>Determinación de la concentración de OTA y propiedades fisicoquímicas en el grano del café en las etapas de beneficio.....</i>	<i>47</i>
7.3.	<i>Aislamiento y selección de hongos con potencial ocratoxigénico.....</i>	<i>51</i>
7.4.	<i>Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas seleccionadas. 56</i>	
7.5.	<i>Ensayo preliminar para el biocontrol de hongos con potencial producción de OTA 62</i>	
7.6.	<i>Optimización del protocolo para la extracción de ADN.....</i>	<i>64</i>
8.	CONCLUSIONES	67
9.	RECOMENDACIONES	69
10.	BIBLIOGRAFÍA	70
11.	ANEXOS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras morfológicas de las partes del cafeto.....	19
Figura 2. <i>Proceso de despulpado de la cereza.</i>	22
Figura 3. Proceso de fermentación para degradación del mucilago.	23
Figura 4. Proceso de lavado del café pergamino.	24
Figura 5. Proceso de secado al sol del café pergamino.....	26
Figura 6. Estructura química de Ocratoxina A (OTA).....	29
Figura 7. Esquema que muestra todas las diferentes hipótesis de la vía de biosíntesis de OTA.....	31
Figura 8: Diagrama de flujo para la metodología.	44
Figura 9: Porcentaje de incidencia de OTA en las etapas de beneficio del café. 45	
Figura 10. <i>Gráfico de caja y bigotes concentración de OTA Vs etapa de beneficio.</i>	48
Figura 11. Propiedades fisicoquímicas por etapa de procesamiento.	49
Figura 12. Selección de hongos potencialmente productores de OTA en agar leche de coco y fluorescencia emitida por exposición UV 365nm. A, B, C. E, y F: fluorescencia emitida por la OTA, D: control negativo (<i>A. brasiliensis</i>) y G: fluorescencia intensificada al rociar amoniaco al 26%.....	55
Figura 13: Caracterización macroscópica de los aislamientos T037-3, T066, T051-2 y T069-1.MEA: (A: reverso, B: anverso y C: textura), CYA 30°C: (D: reverso, E: anverso y F: textura), G: conidióforo, H: hifas y I: esporas.	57
Figura 14: Caracterización macroscópica del aislamiento T031-1. MEA (A: reverso, B: anverso y C: textura); CYA 30°C: (D: reverso y E: anverso); CYA 37°C: (F: reverso y G: anverso); H: conidióforo, I: hifas y J: esporas.....	58

Figura 15: Caracterización macroscópica de aislamiento T048. MEA: (A: reverso, B: anverso y C: textura); CYA 30°C: (D: reverso, E: anverso y F: textura); G: conidióforo, H: hifas y I: esporas.....	59
Figura 16: Caracterización macroscópica de los aislamientos T031-2 Y T069-2. MEA: (A: reverso, B: anverso y C: textura); CYA 30°C: (D: reverso, E: anverso y F: textura); G: conidióforo, H: hifas y I: esporas.....	60
Figura 17: Caracterización macroscópica de los aislamientos T051 Y T040. MEA: (A: reverso, B: anverso y C: textura); CYA 30°C: (D: reverso, E: anverso y F: textura); G: conidióforo, H: hifas y I: esporas.....	61
Figura 18: Ensayo preliminar para biocontrol de hongos con potencial en la producción de OTA. A y B: ensayo con <i>T. harzianum</i> , C, D y E: ensayo con <i>A. brasiliensis</i> , F: controles de <i>A. brasiliensis</i> y <i>T. harzianum</i>	63
Figura 19. Corrida electroforética; MP: Marcado de peso molecular 1Kb; 2: protocolo modificado con columna de purificación y 3: protocolo no modificado...	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Promedios de la composición química del grano de café almendra, según la especie, porcentaje en base seca.....	21
Tabla 2. Concentración de media de OTA en café.....	32
Tabla 3: ANOVA para [OTA] ppb por Etapa.	47
Tabla 4. <i>Prueba de la Mediana de Mood para [OTA] ppb por Etapa de beneficio</i>	48
Tabla 5: Intensidad de la fluorescencia emitida por los hongos seleccionados en agar leche de coco.....	52
Tabla 6. Análisis espectrofotométrico por NanoDrop.	66

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Valores promedio de variables fisicoquímicas (pH, porcentaje de humedad y actividad de agua) y determinación de la concentración de OTA en las diferentes etapas del beneficio del café.....	80
Anexo 2. Composición de los medios usados para la caracterización macro y microscópica.....	82
Anexo 3. Patrones de ramificación conidióforos observados en <i>Penicillium</i>	83
Anexo 4. Gráfico de absorbancia espectrofotométrica – NanoDrop. :	84
Anexo 5: ANOVA para cada una de las propiedades fisicoquímicas analizadas..	85
Anexo 6: principio de la prueba ROSA.	86

1. INTRODUCCIÓN

El comercio del café es uno de los mercados más importantes y tecnificados en la economía mundial, sin embargo, también es susceptible a contaminaciones desde su cosecha hasta su transformación. Por medio de los estudios encontrados en varios países alerta ante las medidas preventivas a tomar en toda la cadena productiva, dichos estudios correlacionan los casos de Aflatoxinas y Ocratoxinas como factores de riesgo causantes de enfermedades como cáncer, efectos nefrotóxicos y afecciones al hígado en humanos y animales (Jaramillo, 2011).

La Ocratoxina A (OTA) representa una de las fuentes de contaminación más importantes en granos, cereales y su derivados a nivel mundial, tanto las industrias de alimentos, como los organismos de salud han centrado su mirada en este metabolito secundario ya que representa un riesgo para la salud de los consumidores, siendo clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer como un posible cancerígeno crónico en humanos tras su consumo habitual, a su vez esta logra producir problemas neurotóxicos, inmunosupresores, genotóxicos y teratogénicos (Ravelo, Rubio, Gutiérrez, y De la Torre, 2006); la OTA es producida por algunas especies de hongos de los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium*, dentro de los cuales se destacan *A. ochraceus*, *P. verrucosum*, y *P. viricatum* (Martínez y Anadón, 2006).

Una de las principales matrices alimentarias que es susceptible a la contaminación por hongos ocratoxigénicos, es el café, el cual es consumido en todo el mundo, se estima que se consume más de dos mil millones de tazas de café en todo el mundo cada día, el consumo mundial de este producto casi que se ha duplicado en los últimos 40 años y se prevé que llegue a más de nueve millones de toneladas para el 2019 (Fairtrade Foundation, 2012). En función del riesgo que presenta la OTA para la salud humana, la Unión Europea ha establecido niveles máximos de OTA permitidos en una gama de productos, incluido el café, los niveles máximos de OTA permitidos son de 5 µg/kg para granos de café tostados y molido y de 10 µg/kg para instantáneo, estos niveles también son adoptados por el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia en la Resolución 4506 del 2013.

De lo anterior, radica la importancia de esta investigación, la cual tuvo como objetivo principal la determinación de la concentración de OTA en las diferentes etapas de beneficio del café (cereza, pergamino, tostado y molido) cultivado y comercializado en Toledo – Norte de Santander, mediante la utilización de la técnica de inmunoensayo ROSA - OCHRAQ-G; los resultados aquí obtenidos brindan un indicio a cerca de la calidad del café que en este municipio se produce, adicional a

esto se realizaron pruebas fisicoquímicas (pH, porcentaje de humedad y A_w) a las muestras analizadas, las cuales dieron a conocer bajo qué condiciones los hongos con potencial en la producción de OTA logran sintetizar dicha micotoxina; a partir de las muestras cuya concentración de micotoxina superó los límites establecidos por las normas vigentes se realizaron aislamientos fúngicos y selección de hongos ocratoxigénicos en agar leche de coco con exposición a luz ultravioleta de 365nm, para su posterior identificación macroscópica y microscópica teniendo como referencia los estudios en identificación y nomenclatura de los géneros *Aspergillus* y *Pencillium* realizados por Samson y Frisvad (2014) y Pitt (2009), dando así a conocer qué tipo de microbiota está implicada en la producción de OTA en el café; por último se realizó la estandarización de un protocolo sencillo y económico para la extracción de ADN genómico de hongos filamentosos asociados a la producción de OTA en café, con el objetivo de obtener ADN de buena calidad para identificación molecular de las cepas fúngicas aisladas.

2. OBJETIVOS

General

Determinar la incidencia de Ocratoxina A y aislar hongos asociados con potencial ocratoxigénico en las etapas de beneficio de café (*Coffea arabica*) producido en Toledo - Norte de Santander

Específicos

- Establecer los niveles de OTA en las diferentes etapas de beneficio del grano del café.
- Determinar las variables fisicoquímicas (pH, humedad y Aw) asociadas al grano del café en sus diferentes etapas.
- Caracterizar macroscópica y microscópicamente las cepas fúngicas con potencial ocratoxigénico aisladas de las muestras con concentraciones significativas de OTA.
- Realizar ensayos preliminares para biocontrol *in vitro* de los hongos potencialmente Ocratoxigénicos.
- Optimizar un protocolo para la extracción de ADN genómico de los hongos filamentosos asociados a la presencia de OTA.

3. JUSTIFICACIÓN

El café es considerado en Colombia como un tejido social, cultural, institucional y político, que más que un producto agrícola es la base de la estabilidad democrática y la integridad nacional (Ramírez, Silva, Valenzuela, Villegas y Villegas, 2002), hablar de café en Colombia constituye una de las principales fuentes de ingresos para los hogares colombianos, según la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia cerca de 563.000 familias productoras de café habita en este país (Fedecafe, 2010). Colombia después de Brasil es el segundo exportador de café en el mundo (Jaramillo, 2011).

Más de 70 países en desarrollo producen café de vital importancia para su balanza de pagos y Brasil creció en promedio 2,5 millones de toneladas anuales de 2007 a 2011. Los principales consumidores se encuentran en las regiones desarrolladas, es decir, EE. UU., Europa y Japón. El café es importante para el desarrollo social y un excelente recurso para el empleo rural, que proporciona trabajo a 125 millones de personas en todo el mundo (Taniwaki, Teixeira, Teixeira A, Copetti y Lamanaka, 2014).

Colombia es el segundo país exportador de café en el mundo seguido de Brasil, es sin duda uno de los países más nombrados a nivel internacional por la producción de café. El cual es un café sobresaliente, suave, de taza limpia con acidez relativamente alta, cuerpo balanceado, aroma pronunciado y un perfil sensorial de excelente calidad (Fedecafe, 2010). Este producto dentro de su procesamiento enfrenta diferentes desafíos que pueden influenciar en su calidad, como lo es la presencia de toxinas fúngicas, metabolitos secundarios asociados al metabolismo de algunos hongos que contaminan y proliferan en muestras de café. La principal micotoxina presente en el café y objetivo de este estudio es la Ocratoxina A (OTA), estas son sustancias de naturaleza química muy tóxicas por su acción contra las células renales, lo que llega a provocar un fallo de los riñones a largo plazo (Vatinno, Aresta, Zambonin y Palmisano, 2008). Aunque se podría asegurar que así como Colombia produce grandes cantidades de café, de igual manera se preocupa por investigar lo relacionado con dicha micotoxina, que afecta la salud de quienes consumen este alimento, pero el panorama actual es otro debido a que en Colombia cuando se quiere indagar acerca de esta problemática es poca o casi nula la información publicada y por ende es necesario incursionar en el estudio de estas micotoxinas presentes en el café convirtiéndose así el tema de interés de esta investigación.

La presencia de Ocratoxina A en el café se descubrió apenas en 1988. Poco después, la Unión Europea puso en marcha un programa de armonización de los reglamentos sobre la presencia de micotoxinas en los alimentos, que comprendía establecer la concentración máxima de OTA en el café (FAO, 2006). Desde ese entonces se ha convertido en una exigencia obligatoria cumplir los requisitos que estipula la normatividad vigente.

Las cerezas y almendras de café se exponen a colonización por microorganismos durante el desarrollo, cosecha, preparación, transporte y almacenamiento. Las cerezas están expuestas a daños por insectos, aves y factores macro/microambientales perjudiciales (Paterson y Lima, 2011), que influirán en cómo se desarrollarán los hongos ocratoxigénicos. Las cerezas y granos de café pueden estar contaminados por OTA y/o hongos micotoxigénicos, que presentan un riesgo de contaminación, compromete la seguridad y calidad del producto (Batista, Chalfoun, Silva, Cirillo, Varga y Schwan, 2009). Curiosamente, una razón de la baja incidencia y niveles de micotoxinas en los granos de café verde puede estar relacionada con la inhibición del crecimiento fúngico por la cafeína en el café (Micco, Grossi, Miraglia y Brera, 1989). Sin embargo, algunas cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus* han producido altas concentraciones de AFB y OTA con 0,1-1,0% de cafeína añadida a los medios de cultivo (Nakajima, Tsubouchi, Miyabe, y Ueno, 1997).

La presencia de OTA en los granos de café puede deberse tanto a las condiciones ambientales (clima, tiempo de almacenamiento y transporte) como a las condiciones de procesamiento (procesos húmedos, mecánicos o secos) (Romani, Sacchetti, Lopez, Pinnavia y Rosa, 2000). La aparición y la formación de OTA en el proceso de secado ha sido estudiada por varios autores (Bucheli, Kanchanomai, Meyer y Pittet, 2000; Urbano, Taniwaki, Leitao y Vicentini, 2001). Se ha logrado determinar la presencia de OTA antes del almacenamiento, lo que indica la posibilidad de que la cosecha y el manejo poscosecha de las cerezas de café sean los pasos críticos que llevan a la contaminación por esta micotoxina (Bucheli, *et al.*, 2000). Actualmente, hay poca información disponible sobre la presencia de mohos productores de OTA en los granos de café beneficiados y el impacto de estos procesos en la producción o presencia de esta micotoxina. Las publicaciones indican que el proceso de despulpado reduce significativamente el riesgo de contaminación por OTA durante las etapas de beneficio, dando así una gran importancia los estudios micológicos los cuales son necesarios para proteger el café de la formación de OTA, existe una necesidad real de identificar mohos capaces de producir esta micotoxina en el café y su relación con las etapas de beneficio.

Los resultados obtenidos en este estudio se podrán utilizar como referente para encontrar posibles soluciones a este problema, brindando a los agricultores capacitaciones en cuanto al beneficio del café (producción, cosecha, almacenaje y transporte), plantear el uso de microorganismos como biocontroladores de hongos productores de OTA, evitando así la colonización de estos microorganismos en las

etapas de beneficio del café, para de esta manera poder encaminar todos los esfuerzos y tecnologías para la producción de un producto inocuo y de calidad, el cual no represente un riesgo para la salud del consumidor.

Esta investigación representa un importante aporte en conocimiento científico ya que en nuestro país a pesar de ser un gran productor de café, no se encontraron estudios en este tema, por lo cual la información que en este documento se encuentra podrá ser utilizada como insumo para alentar a la realización de nuevas investigaciones de OTA en café y así poder exponer un panorama más amplio en cuanto a contaminantes químicos en matrices alimentarias de gran interés económico en Colombia.

A su vez este trabajo representa un enorme impacto social, ya que se logra evidenciar el verdadero estado y calidad del café que se produce en Toledo, pudiendo así plantear soluciones reales a los caficultores de la región que en su mayoría son personas que realizan las actividades de manera empírica, estas soluciones se enfocan en fortalecer los procesos de beneficio para que durante todas las etapas se elimine o se reduzca el riesgo de contaminación por OTA, pudiendo así producir un alimento inocuo y de calidad, para que el consumidor tenga la total seguridad de que no está consumiendo un producto que pueda acarrear graves problemas en su salud.

4. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS

Con el planteamiento de los siguientes enunciados, se busca determinar si estadísticamente existen diferencias significativas a un valor $p < 0,05$ en la concentración de OTA en las diferentes etapas de beneficio.

Hipótesis nula:

- $H_0 = \mu_C = \mu_P = \mu_T = \mu_M$

Hipótesis alterna:

- $H_0 \neq \mu_C \neq \mu_P \neq \mu_T \neq \mu_M$

Donde:

$\mu_C =$ media en la concentración de OTA en la etapa de Cereza.

$\mu_P =$ media en la concentración de OTA en la etapa de Pergamino.

$\mu_T =$ media en la concentración de OTA en la etapa de Tostado.

$\mu_M =$ media en la concentración de OTA en la etapa de Molido.

5. MARCO REFERENCIAL

5.1. MARCO TEÓRICO

5.1.1. Generalidades del café

El café pertenece a la familia botánica *Rubiaceae*, la cual agrupa 500 géneros y más de 6.000 especies, son arbustos que se desarrollan en las partes bajas de los bosques, sus hojas se ubican sobre las ramas en forma opuesta, son de peciolo corto entre ovaladas y lanceoladas, las flores son blancas con olor y color parecido al jazmín poseen cinco pétalos y son de forúnculo corto (**Figura 1**) (Fedecafé, 1998). Otros miembros de la familia incluyen las gardenias y plantas que producen quinina entre otras sustancias útiles, pero el *Coffea* es el miembro más importante de la familia, económicamente hablando (Food inf, 2017).

Los granos de café o semillas, están contenidos en el fruto, que en el estado de madurez es de color rojo y se le denomina "cereza". Cada cereza consiste en una piel exterior que envuelve una pulpa. Debajo de la pulpa están los granos recubiertos por una delicada membrana dorada; estas membranas envuelven las dos semillas de café (**Figura 1**). La semilla del café es de aproximadamente un centímetro de largo, que al tostarla y molerla se usa para preparar una bebida estimulante y energética (Beer, Muschler, Kass y Somarriba, 1998).

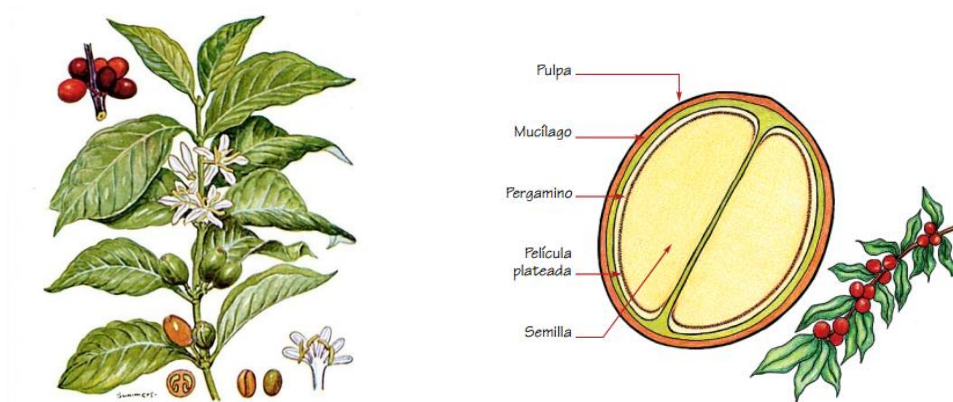


Figura 1. Estructuras morfológicas de las partes del cafeto.
Fuente: CENICAFE, 2011.

5.1.2. Taxonomía

Las principales especies del café que se utilizan para la preparación de la bebida del café son: *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Waller, Bigger y Hillocks, 2007).

El café presenta la siguiente clasificación botánica:

Reino: *Plantae*

Tipo: *Espermatofitas*

Sub-tipo: *Angiospermas*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Gentianales*

Familia: *Rubiaceae*

Subfamilia: *Ixoroideae*

Tribu: *Coffeae*

Género: *Coffea*

Sub-género *Eucoffea*

Especies: *Coffea arabica*, *Coffea benghalensis*, *Coffea canephora*, *Coffea congensis*, *Coffea excelsa*, *Coffea gallienii*, *Coffea bonnierii*, *Coffea mogenetii*, *Coffea liberica*, *Coffea stenophylla* (Krug, Mendes y Carvalho, 1949). Las dos especies más importantes desde el punto de vista económico son *Coffea arabica* L. (café arábica) y *Coffea canephora* (café robusta). Otra especie también conocida pero cultivada en menor escala es *Coffea liberica* (café libérica).

Coffea arabica fue descrito por primera vez en 1753 por Linneo. Es genéticamente diferente a las demás especies de café, ya que es tetraploide, por lo que tiene un total de 44 cromosomas en lugar de 22. Se trata de un arbusto grande, de unos 5 metros de altura, con hojas ovaladas y de color verde oscuro brillante. La floración se produce después del periodo de lluvias, y sus flores son blancas, de aroma dulce y están dispuestas en racimo. Los frutos, verdes y ovalados, se vuelven rojos cuando maduran, al cabo de 7-9 meses. Cada fruto contiene habitualmente dos semillas de aspecto chato y aplanado (los granos de café). *Coffea arabica* se cultiva en toda Latinoamérica, en África Central y Oriental, en la India y en Indonesia (Masefield Wallis, Harrison y Nicholson, 1980).

La especie *Coffea canephora* es un árbol robusto con raíz poco profunda que puede alcanzar los 10 metros de altura. El fruto es redondeado y tarda hasta 11 meses en madurar. Su semilla es alargada y más pequeña que la del *C. arabica*, mientras que

las hojas por lo general suelen ser más grandes. El café robusta se cultiva en África Central y Occidental, en todo el Sudeste de Asia y minoritariamente en Brasil, donde se le conoce como “Conillón” (Waller, *et al.*, 2007).

5.1.3. Composición química de la semilla del café

El café, químicamente está compuesto de agua y materia seca. La materia seca de los granos está constituida por minerales y por sustancias orgánicas como lo son carbohidratos, lípidos, proteínas, alcaloides, como la cafeína y la trigonelina, así como, por ácidos carboxílicos y fenólicos, y componentes volátiles que dan el aroma.

Los granos tostados contienen varios de los compuestos químicos que se encuentran en la almendra, pero difieren en sus concentraciones; y además, se detectan otras sustancias que se forman a causa de las diversas reacciones, durante la tostación.

Los granos de café almendra de las variedades de *Coffea arabica* contienen una mayor cantidad de lípidos y de sacarosa que *Coffea canephora* (Robusta), mientras que en la composición de Robusta se destaca el mayor contenido de polisacáridos, cafeína, ácidos clorogénicos y cenizas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Promedios de la composición química del grano de café almendra, según la especie, porcentaje en base seca.

Componente químico	Arábica (%)	Robusta (%)
Polisacáridos	50,8	56,40
Sacarosa	8,00	4,00
Azúcares reductores	0,10	0,40
Proteínas	9,80	9,50
Aminoácidos	0,50	0,80
Cafeína	1,20	2,20
Trigonelina	1,00	0,70
Lípidos	16,20	10,00
Ácidos alifáticos	1,10	1,20
Ácidos clorogénicos	6,90	10,40
Minerales	4,20	4,40
Compuestos aromáticos	trazas	trazas

Es esta tabla se agrupan los valores promedios en cuanto a la composición química del café tipo arábica y robusta. Fuente: CENICAFE, 2011.

5.1.4. Generalidades del procesamiento del café

El proceso de beneficio de café consiste en un conjunto de operaciones para transformar los frutos de café, en café pergamino de alta calidad, el cual por su estabilidad en un amplio rango de condiciones ambientales, es el estado en el cual se comercializa internamente este producto en Colombia.

El beneficio es realizado por los caficultores, en su gran mayoría, en las instalaciones que tienen en sus fincas, a las que denominan beneficiaderos, y donde realizan el recibo, despulpado, remoción de mucílago, lavado, diversas clasificaciones y secado (Sanz, Oliveros, Ramírez, Peñuela y Ramos, 2013), este proceso puede realizarse por vía húmeda o vía seca.

5.1.5. Beneficio del café por vía húmeda

5.1.5.1. Despulpado de café.

El despulpado del café es la primera etapa del beneficio húmedo en la que el fruto pasa por una transformación, dado que se dejan libres de pulpa o cáscara. Esta labor la realizan las máquinas despulpadoras, las cuales aplican esfuerzos cortantes y de compresión a los frutos para que la pulpa se rasgue y salgan libremente los dos granos, gracias también a la acción lubricante del mucílago que las recubre (**Figura 2**).



Figura 2. Proceso de despulpado de la cereza.
Fuente: Manual Cafetero (CENICAFE), 2013.

5.1.5.2. Remoción de mucílago de café.

El mucílago es una película gelatinosa que queda expuesta cuando el fruto es despulpado, se caracteriza por tener una fuerte capacidad de retención de agua debido a su composición, por lo que su contenido de humedad puede ser muy variable de acuerdo con las condiciones climáticas que prevalezcan durante la recolección. El mucílago del café representa en promedio el 14,85% del peso del fruto fresco (Rodríguez, 1993) y 25,3% del peso del café recién despulpado (Peñuela Pabón, Rodríguez y Oliveros, 2010).

La fermentación natural es la manera más sencilla y tradicional para degradar el mucílago, dado que en ella se interrelacionan los agentes suministrados por el ambiente (**Figura 3**). El mucílago del café con su composición rica en azúcares y agua, es un medio adecuado para que los microorganismos, como levaduras, mohos y bacterias, realicen las transformaciones de estos compuestos, generando sustancias como alcoholes y ácidos orgánicos los cuales son solubles en el agua, lo que se facilita el lavado posterior. Este proceso, sucede espontáneamente y se lleva a cabo a través del tiempo, con el cual se determina la finalización del mismo. En estudios realizados por Peñuela y colaboradores, (2010), se evaluó el efecto de la selección del café antes del despulpado (calidad de la materia prima) y de la cantidad de café en el tanque sobre el tiempo de fermentación, determinado mediante una remoción de mucílago superior al 97%.



Figura 3. *Proceso de fermentación para degradación del mucilago.*
Fuente: Manual Cafetero (CENICAFE), 2013.

5.1.5.3. Lavado de café.

Una vez degradado el mucílago por fermentación natural o por la adición de enzimas, se procede con el lavado, el cual tiene como finalidad principal remover definitivamente el mucílago de los granos de café, con el fin de evitar manchas sobre el pergamino o la aparición posterior de sabores desagradables (**Figura 4**). Sin embargo, dada la necesidad del uso de agua en esta etapa, muchos de los dispositivos usados para lavado son usados simultáneamente para la clasificación del café por densidad. En el lavado interviene el agua necesariamente como insumo al proceso, por lo que se deben considerar dos aspectos fundamentales para que la operación sea eficaz: La calidad y la cantidad. En cuanto al primer aspecto se recomienda utilizar agua limpia, no recirculada, de modo que no genere contaminación cruzada al café y no altere su inocuidad. La cantidad del agua que se utilice en el proceso depende de la forma como se realice la operación. Existen diferentes tecnologías para realizarla, las cuales difieren principalmente en la infraestructura disponible y en el efecto sobre los volúmenes de agua que se usan en el proceso.



Figura 4. *Proceso de lavado del café pergamino.*
Fuente: Manual Cafetero (CENICAFE), 2013.

5.1.5.4. Secado del café.

El alto contenido de humedad del café después del lavado: 52,7% a 53,5% (Puerta, 2005), su composición química y las condiciones del clima en las regiones cafeteras colombianas son favorables para el desarrollo de microorganismos, principalmente mohos y levaduras, que pueden afectar su calidad e inocuidad. Los microorganismos pueden provenir del campo, de los árboles (Coliformes totales), por el contacto con las manos de los recolectores (Coliformes y Estreptococos fecales) y de las aguas de lavado, también existe la posibilidad de contaminación en las instalaciones del beneficiadero (Archila, 1985).

Al secar un producto agrícola hasta los niveles exigidos en la comercialización (10% a 12%), se reduce la actividad del agua a niveles que impiden el desarrollo de microorganismos y disminuye notoriamente su actividad metabólica.

Con el conocimiento de la actividad del agua se pueden definir las condiciones de temperatura y humedad relativa más favorables para la conservación de los granos en almacenamiento y durante su procesamiento. La actividad del agua mínima para el crecimiento de microorganismos como *Aspergillus ochraceus* varía de 0,77 a 0,83 y para la producción de la OTA de 0,83 a 0,87 (Urbano y Taniwaki, 2000). Pardo, Ramos, Sanchis y Marín (2005) no observaron producción de OTA con actividad del agua de 0,80. De acuerdo con Suárez, *et al.*, (2004) con la actividad del agua inferior a 0,80 el café está protegido de *A. ochraceus*. En estudios realizados con café lavado, se observó mayor presencia de *Fusarium spp.* y *Penicillium spp.*, seguido de *Cladosporium spp.*, durante el proceso de secado solar. Aunque en el proceso de secado los granos de café se llevan hasta un contenido del 10% al 12% (base húmeda), su contenido de humedad puede variar posteriormente dependiendo de las condiciones ambientales del lugar donde sean almacenados, principalmente la temperatura, la humedad relativa y del tiempo de almacenamiento, hasta alcanzar el equilibrio que en el caso del café y de las regiones cafeteras colombianas es superior al 12%. En estas condiciones de contenido de humedad, la actividad del agua es superior a 0,80, permitiendo el desarrollo de la mayoría de hongos que pueden afectar su calidad sensorial e inocuidad (Puerta, 2005).

5.1.5.5. Secado solar del café.

La energía solar que llega a la Tierra es una pequeña fracción de la energía generada por el sol, permitiendo la vida y todas las manifestaciones como corrientes de aire, actividad fotosintética, ciclos hídricos y corrientes oceánicas, entre otras. La energía que llega hasta el suelo es la resultante de la radiación solar directa y la difusa. En días soleados predomina la radiación directa, mientras que la difusa lo hace en los días nublados. En el secado solar del café en Colombia, en días de mayor flujo de la cosecha, se aprovecha principalmente la radiación difusa y la energía del aire (**Figura 5**).

Tecnologías para el secado solar del café se aprovecha la energía natural del aire y la radiación solar, que inciden directamente sobre la superficie de los granos. Cuando una masa de café tiene una altura de capa de secado de 2,5 cm, la superficie del café representa solamente el 2,71% del total de granos que aprovechan la radiación directa. Teniendo en cuenta lo anterior, el café debe revolverse al menos cuatro veces al día (Roa y Oliveros, 1999), para permitir que otros granos aprovechen también la radiación solar directa, obtener un producto con

humedad final más uniforme y aprovechar más eficientemente la energía empleada en el proceso de secado.

Los secadores solares se han diseñado para atender las necesidades de secado en fincas con producción máxima de 1.875 kg de café pergamino seco por año. Los menores tiempos de secado (3 a 7 días), se han obtenido con un promedio de brillo solar superior a 5 h.día⁻¹, con altura de capa máxima de café lavado de 2 cm (13 kg de café lavado/m²), revolviendo el café por lo menos 4 veces al día, utilizando rastrillos diseñados en Cenicafé (Oliveros, Ramírez, Sanz y Peñuela, 2006).



Figura 5. *Proceso de secado al sol del café pergamino.*
Fuente: Manual Cafetero (CENICAFE), 2013.

5.1.5.6. *Tostación y molienda.*

La tostación del café es un proceso que depende de la temperatura, el tiempo, la tecnología del equipo tostador y de la calidad de la materia prima; en general, los granos se tuestan durante 6 a 15 minutos. Según el grado de tostación, los granos de café tostado presentan diferentes características en el color, aspecto, volumen, densidad, pérdida de peso y cambios en la composición química ya que producen diferentes sabores y aromas. En la torrefacción se desarrollan diversas reacciones entre los componentes del grano de café almendra, mediante la acción del calor. Entre estos cambios se destacan la desecación, la caramelización de la sacarosa, la degradación de aminoácidos, la reacción de Maillard, la despolimerización de carbohidratos, las oxidaciones de los lípidos y ácidos clorogénicos, la formación de ácidos, el cambio de la coloración del grano de verde a marrón y la producción de compuestos volátiles y de las melanoidinas.

En la tostación se pierde peso por la evaporación del agua, compuestos volátiles y CO₂ formados. Estas pérdidas de peso en la tostación se miden por porcentaje. Una

tostación de grado bajo corresponde a pérdidas de peso inferiores a 14%, media entre 14% y 17% y altas por encima de 17%. La intensidad de las propiedades organolépticas de la bebida de café varía con el grado de tostación así: A mayor grado se intensifican el amargo, el cuerpo y se disminuye la acidez de la bebida. Las mezclas de las variedades de café Arabica de Colombia preparadas en una tostación media presentan características sensoriales muy buenas, equilibradas y suaves.

Los microorganismos del grano de café se eliminan con el calor en la tostación, sin embargo, no toda la OTA del grano se degrada. Por el contrario, los defectos generados por el fenol y vinagre producidos en el cultivo o beneficio sí se sienten en el aroma del café tostado (CENICAFE, 2013).

El café tostado debe molerse para aumentar el área superficial de contacto con el agua y así facilitar la extracción de los compuestos del aroma y sabor. Mientras más finas las partículas, más rápida es la velocidad en la preparación de la infusión. El tamaño de la molienda está determinado por el método y equipo de preparación. En general, el molido grueso (tamaño de 1 mm) se aplica para percoladores de café domésticos, el molido medio (0,5 mm) para cafeteras de goteo y el molido fino (menor a 50 micras) para preparaciones expreso (Peláez y Moreno, 1991; FNC, 1998).

Otro método de beneficiar el café es a través del proceso conocido como beneficio agrícola por la vía seca, que consiste en deshidratar el café cereza por medios naturales o artificiales, hasta un nivel en que puede ser llevado a la piladora para la eliminación física de las envolturas del almendro, una vez retiradas las envolturas del almendro, el grano se selecciona y clasifica cuidadosamente, teniendo en cuenta su tamaño, peso, color y defectos. Finalmente, estos granos seleccionados se tuestan para que desarrollen el sabor y aroma del café, se muelen y quedan listos para la preparación de la bebida (Beer *et al.*, 1998).

5.1.6. Beneficio de café y las Buenas Prácticas de Manufactura

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son los principios básicos y prácticas generales de higiene en la manipulación, preparación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte y distribución de alimentos para consumo humano, con el objeto de garantizar que los productos se fabriquen en condiciones sanitarias adecuadas y se disminuyan los riesgos inherentes a la producción (Ministerio de Salud y Protección Social, 1997). Si bien el café no es un alimento, el proceso del café está regido por el Decreto MS 3075 de 1997, por ser el proceso para obtener un producto para el consumo humano. Las BPM son normas dirigidas a sectores específicos relacionados todos con productos que puedan incidir directamente

sobre la salud de las personas. Al aplicar Buenas Prácticas de Manufactura en el proceso de beneficio de café se garantiza además de un producto para consumo humano higiénico y de buena calidad, sumado a esto las reducciones en el consumo de agua, en la energía eléctrica y en el impacto ambiental. Para tal fin debe considerarse el proceso a utilizar, la infraestructura donde se lleva a cabo el proceso, las máquinas y equipos en los que se lleva a cabo el proceso, y la calidad y estado de la materia prima a transformar.

Para disminuir la ocurrencia de defectos en el café y reducir las pérdidas económicas y en la calidad se recomienda aplicar las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la finca, y las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en las otras etapas de producción del café. Así, todos los procesos del café se deben efectuar en condiciones higiénicas y además, deben controlarse sus etapas críticas (Puerta, 2006).

5.1.7. Ocratoxina A

La Ocratoxina A ($C_{20}H_{18}O_6NCl$) está conformada por un anillo de 3,4-dihidro metilisocumarina unido por medio de su grupo carboxilo y través de un enlace tipo amida a una molécula de fenilalanina (**Figura 6**). Es muy estable, incolora, soluble en disolventes orgánicos polares, poco soluble en agua, con características de ácido débil y capaz de emitir fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta (Monaci y Palmisano, 2004). Detectada por primera vez en muestras de maíz africanas, es considerada un metabolito secundario tóxico producido por especies de hongos filamentosos superiores de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, capaces de crecer sobre una amplia gama de sustratos orgánicos (Van der Merwe, Steyn y Fourie, 1965).

Los cereales, en humanos y los piensos, en animales, constituyen las principales fuentes de exposición alimentaria, aunque también pueden encontrarse niveles notables de contaminación en otras matrices alimentarias. Los granos de café verde, la carne y sus derivados, las uvas, el vino, las pasas e higos secos (Blanco, Pavón, González, García y Martín, 2007), el chocolate, las legumbres, la cerveza y las especias, constituyen fuentes dietéticas a considerar sólo en caso de altas ingestas. Otras fuentes no convencionales de OTA son el té, las infusiones, el aceite de oliva y los alimentos infantiles a base de cereales (Duarte, Peña y Lino, 2009). Las prácticas agrícolas y las condiciones medioambientales (humedad y temperatura) durante el almacenamiento y el transporte afectan de forma directa a los niveles de OTA en los alimentos. Asimismo, se ha demostrado que una alta actividad de agua favorece la producción de OTA en los alimentos (Marín, Bellí, Ramos y Sanchis, 2005).

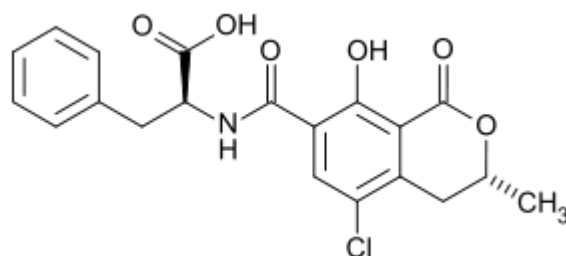


Figura 6. Estructura química de Ocratoxina A (OTA).

Fuente: Ravelo et al., (2011).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, la OTA se absorbe fácilmente del tracto gastrointestinal, siendo su biodisponibilidad superior al 50% en todas las especies de mamíferos ensayadas. Presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, lo que determina una larga persistencia en el organismo. Los principales metabolitos son el producto de hidrólisis del enlace amida (OTA), los derivados hidroxilados 4-OH-OTA y 10-OH-OTA y los productos de conjugación, entre otros. Se elimina por vía renal y hepatobiliar, así como también a través de la secreción láctea. La DL_{50} oscila entre 0,2 y 58,3 mg/kg pc; los perros, cerdos y pollos son especies más sensibles que la rata y el ratón (López de Cerain, Jiménez y Ezpeleta, 2000).

5.1.7.1. Hongos productores de OTA

Aspergillus ochraceus, *Penicillium verrucosum* y *P. viricatum*, se consideran los principales productores de Ocratoxina A en alimentos debido a su gran facilidad de dispersión y crecimiento. *Aspergillus* crece en un intervalo de temperatura comprendido entre 12 - 37°C, y se asocia a climas cálidos y tropicales, detectándose sobre todo en alimentos almacenados. Abarca y colaboradores en 1994 describieron, por primera vez, la producción de OTA por *A. niger var. niger*, y desde entonces son numerosos los estudios que describen la producción de OTA por otras especies negras de *Aspergillus* presentes en viñedos (Abarca, Bragulat, Castellá y Cabañes 1994). El género *Penicillium* crece en un intervalo de temperatura más bajo (4 - 31°C) y con una actividad de agua de 0,80 por lo que va a contaminar alimentos producidos en climas templados y fríos, especialmente en cereales y derivados. Entre todas ellas, *Aspergillus carbonarius* y *P. purpurogenum* se caracterizan por tener un alto potencial ocratoxigénico (Serra, Abrunhosa, Kozahiewicz y Venâncio, 2003).

5.1.7.2. Biosíntesis de OTA

La biosíntesis de OTA ha sido supuestamente hipotética y existen varias contradicciones en algunos procesos de la ruta biosintética.

A diferencia de otras micotoxinas importantes, la vía de biosíntesis de la OTA aún no se ha dilucidado completamente en detalle. Sin embargo, está claro que la vía implica algunos pasos cruciales, como la biosíntesis del grupo de isocumarina a través de la acción catalizadora de una policétido sintasa (PKS), su ligadura con el aminoácido fenilalanina a través del grupo carboxilo en una reacción catalizada por un péptido sintetasa y el paso de cloración, pero el orden de las reacciones aún no está bien definido (Wang *et al.*, 2016).

De tal manera, se han propuesto varios esquemas que han resultado de diferentes estudios. Huff y Hamilton (1979) sugirieron un papel en la síntesis de policétidos para la melleína, que se carboxilaría a OT β y luego se transformaría a través de una cloroperoxidasa en OT α . De acuerdo con su hipótesis, en el paso siguiente, OT α se fosforilaría y se uniría al éster etílico de la fenilalanina para generar OTC, y luego una desesterificación conduciría al producto final OTA (**Figura 7**). Experimentos de alimentación de precursores con *A. ochraceus*, llevados a cabo por Harris y Mantle (2001), sugirieron que una vía biosintética, posiblemente y dominante, implica el paso de OT β a OT α y luego a OTA, con una etapa de cloración previa a la ligadura del policétido (OT α) a la fenilalanina, sin intermediarios OTC y éster etílico de fenilalanina. Dado que no podían descartar el papel de OTB, también mantienen una posible vía alternativa en la que la formación de OTA pasa por la síntesis de OT β a OTB, pero en este caso, un papel biosintético para OT α , que ocurre de forma natural, no podría ser explicado. Todas las rutas hipotéticas para la biosíntesis de OTA se resumen en la figura 7, en el que también se contempla la esterificación o no de fenilalanina y la consiguiente presencia de éster etílico de OTB con un papel intermediario.

5.1.7.3. Toxicidad de la OTA

La OTA es nefrotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena, teratogénica y neurotóxica (Kuiper, 1996). Respecto a la actividad carcinogénica, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) ha clasificado a esta micotoxina en la categoría 2B, es decir, como posible carcinógeno humano. La exposición a alimentos contaminados con OTA se ha relacionado con evidencias epidemiológicas de cáncer testicular debido a la formación de aductos con el ADN inducido por la acción de este genotóxico (Schwartz, 2002).

Los biomarcadores urinarios de OTA ofrecen mejor resultados frente a la exposición de OTA que los niveles detectados en plasma (Scott, 2005). La toxicidad aguda de la OTA presenta variaciones interespecíficas. La DL₅₀ por vía oral presenta un intervalo entre 20-50 mg/kg en ratas y ratones, y entre 0,2-1 mg/kg en perros, cerdos y pollos, que son las especies más sensibles. Los síntomas de una intoxicación aguda consisten en pérdida de peso, poliuria, polidipsia y hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en los órganos de mayor actividad

metabólica (bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón), así como nefrosis y necrosis hepáticas (López de Cerain A y Soriano J, 2007).

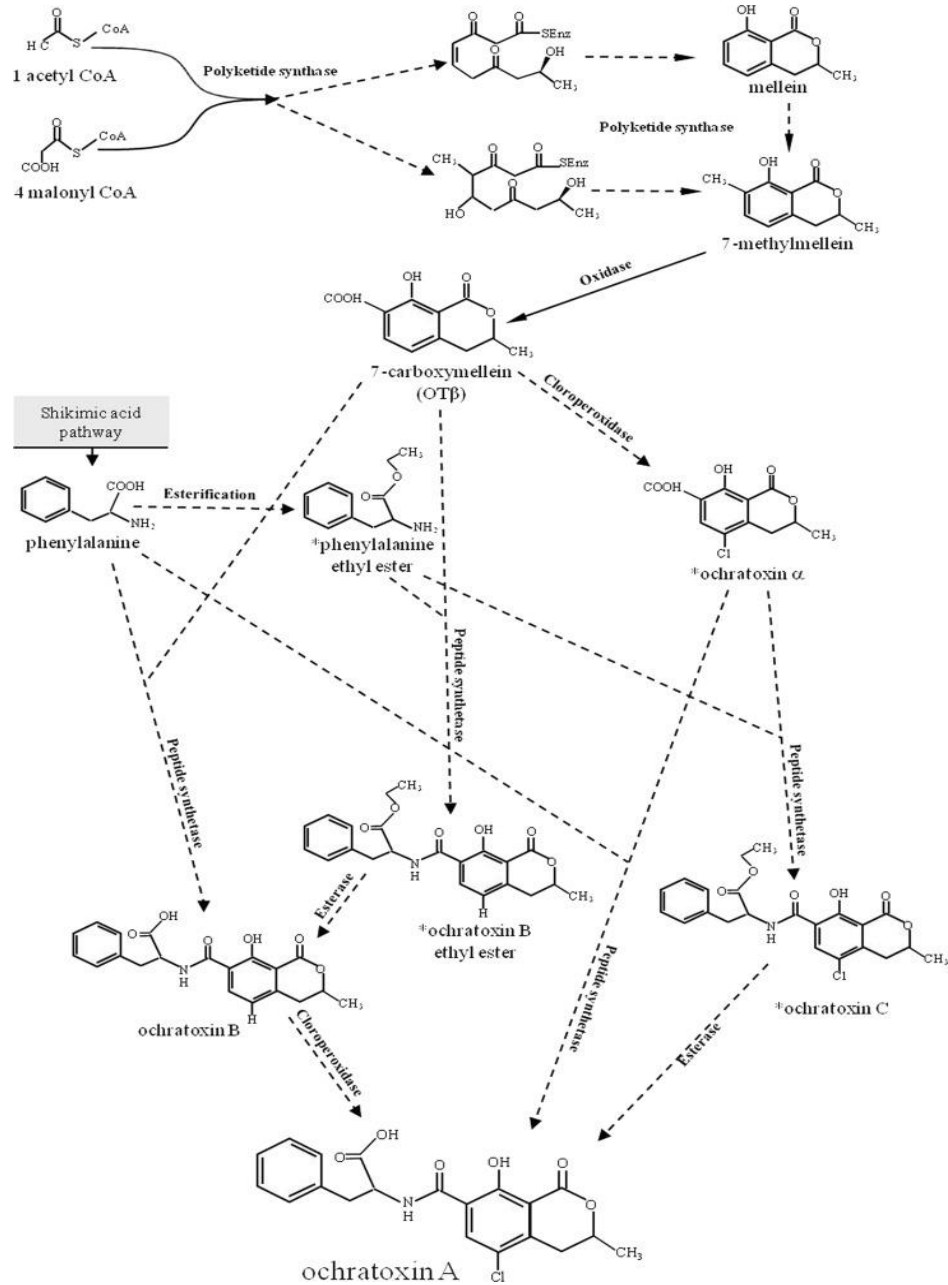


Figura 7. Esquema que muestra todas las diferentes hipótesis de la vía de biosíntesis de OTA.

Fuente: Gallo et al., (2012)

La toxicidad crónica de la OTA se traduce en una nefropatía intersticial en los animales de granja (pollos y cerdos) conocidas como nefropatías porcinas y aviares

La OTA constituye, además, el principal factor determinante del desarrollo de tumores en el tracto urinario en el hombre y de la “*Nefropatía endémica de los Balcanes*” (William, Berndt, Wallace y Phillips, 1980), presentando gran incidencia en las regiones del sudeste de Europa (Bosnia, Serbia, Croacia, Bulgaria y Rumanía), y caracterizada por ser una grave afección histopatológica que cursa con una neuropatía túbulo-intersticial progresiva, que deriva en atrofia tubular y fibrosis periglomerular, produciendo daños similares a los observados en animales. Finalmente, algunos autores apuntan que individuos en estado de malnutrición son especialmente sensibles a los efectos adversos de las micotoxinas (Araguas González, López de Cerain y Bello, 2003).

5.1.8. *Ocratoxina A en café*

La presencia de *Ocratoxina A* en café ha tomado un gran interés, desde su primer estudio en muestras de café verde y sobre todo en la detección de la toxina en muestras de café tostado e infusiones de café (Levi, Trenk y Mohr, 1974). Se han realizado numerosos estudios que demuestran que el procedimiento de tostado influye sobre la destrucción de OTA, a pesar de que los resultados son bastante contradictorios, ya que algunos autores opinan que no se detectan diferencias significativas, inferiores al 12% en lo relativo a la reducción de OTA por la operación del tostado, mientras que otros autores afirman que se reduce la producción de OTA en torno a un 80%, o incluso valores superiores (Pittet, Tornare, Huggett y Viani, 1996). Según Blanc, Pittet, Muñoz y Viani (1998) la variación de los niveles de *Ocratoxina A* se reduce entre un 84 - 87%, tras realizar maniobras operacionales en los granos de café verde, principalmente tostado, molienda y trituración para obtener café en polvo.

Diversos trabajos demuestran una reducción en el contenido de OTA de la infusión de café con respecto al café tostado de partida. En este caso el modo de preparación de la infusión parece tener un papel determinante en la producción de OTA, siendo el sistema “expreso” el más eficaz, seguido de la cafetera italiana a rosca, y éste a su vez más que el de cafetera de filtro, pero la eliminación nunca es completa y en ningún caso superior al 50% (López de Cerain y Soriano, 2007). La concentración media de OTA (**Tabla 2**) del café es variable en función de las operaciones agrotecnológicas realizadas sobre el grano de café.

Tabla 2. *Concentración de media de OTA en café.*

<i>Tipos de café</i>	<i>Concentración promedio de OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)</i>
<i>Café verde</i>	2,38

<i>Café molido</i>	0,880
<i>Café tostado</i>	1,430
<i>Café soluble</i>	1,300
<i>Café descafeinado</i>	0,550
<i>Café instantáneo</i>	2,200

Se muestran los valores medios de concentración de OTA en diferentes etapas y tipos de café;

N.D: Límite de Concentración No Detectado.

Fuente: Ravelo *et al.*, (2006).

Los valores de concentración de OTA obtenidos por diferentes autores en café, muestran que existen muestras, que superan el límite máximo establecido según legislación vigente (5 µg/kg para café tostado en grano y molido; 10 µg/kg para café soluble e instantáneo), a pesar que los valores medios de concentración de OTA de las muestras de café no superan los valores propuestos.

El café es un alimento importante en el consumo humano, y a pesar de los avances tecnológicos ni el proceso de tostado ni el de preparación aseguran la destrucción completa de OTA, por lo que es necesario un correcto control de higiene en la producción de café verde para preservar la salud de los consumidores, disminuyendo así su exposición de esta toxina (Ravelo *et al.*, 2006).

La susceptibilidad del café a la contaminación por hongos (Peraica, Radic, Lucic y Pavlovic, 1999) es debida a que, por razones económicas, permanece almacenado durante largos periodos, generalmente sin control de la humedad y de temperatura; y debido a que es un alimento con un elevado consumo, la población tiene una alta probabilidad a ser contaminada por esta toxina, ya que el tostado de café no es un proceso que asegure su total destrucción, por lo que una taza de café podría contener cantidades elevadas de ocratoxinas (Carrillo, 2003), las cuales, por presentar gran afinidad con las proteínas plasmáticas, aseguran su persistencia en el organismo (López de Ceraín, *et al.*, 2000).

5.2. BASES LEGALES

La Constitución Política de 1991 estableció un conjunto importante de derechos y deberes del Estado, las instituciones y los particulares en materia ambiental, enmarcado en los principios del desarrollo sostenible. Los artículos 8, 79 y 80 de la Constitución Política señalan que es deber del Estado proteger la diversidad e integridad del ambiente, conservar las áreas de especial importancia ecológica, fomentar la educación para el logro de estos fines, planificar el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución. Asimismo, el artículo 8 y el numeral 8

del artículo 95 de la Constitución Política disponen que es obligación de los particulares proteger los recursos naturales del país y velar por la conservación de un ambiente sano.

Leyes:

- **Ley 76 de 1927.** Sobre protección y defensa del café.
- **Ley 76 de 1931.** Provee el fomento de la industria cafetera.
- **Ley 11 de 1972.** Por la cual se deroga el impuesto de exportación de café y se dictan otras disposiciones.

Decretos:

- **Decreto 2078 de 1940.** Se dictan medidas relacionadas con la industria del café.

Resoluciones:

- **Resolución 02309 de 1986 Ministerio de la Protección Social.** Por la cual se dictan normas para el cumplimiento del contenido del Título III de la parte 4a. del Libro 1o. del Decreto - Ley No. 2811 de 1974 y de los Títulos I, II y XI de la Ley 09 de 1979, en cuanto a Residuos Especiales.
- **Resolución 355 de 2002 - Ministerio de Comercio Exterior.** Requisitos relacionados con la Inscripción en el Registro Nacional de Exportadores de Café.
- En Colombia, existen normas que reglamentan los requisitos que debe cumplir el café tanto en su etapa de producción como en el producto final, dicha reglamentación busca un café inocuo y de calidad, buscando suplir las necesidades del mercado actual.
- **Resolución N° 01 de 2009 del comité nacional de cafeteros.** Resolución que reglamenta la inscripción en el Registro Nacional de Exportadores de Café, por lo tanto es de suma importancia que el exportador conozca el objetivo de esta y demás derivados que la conforman.
- **Ministerio de Salud y Protección Social – Resolución 4506 del 2013.** Por la cual se establecen los niveles máximos de contaminantes en los alimentos destinados al consumo humano y se dictan otras disposiciones

- **Ministerio de Salud y Protección Social – Resolución 4506 de 2013.** Por la cual se establecen los niveles máximos de contaminantes en los alimentos destinados al consumo humano y se dictan otras disposiciones

Normas Técnicas Colombianas:

- **NORMA TÉCNICA COLOMBIANA - NTC 3314.** 1992. Café y sus productos. Vocabulario. Términos y definiciones. Define los términos más comúnmente utilizados en relación con el café y sus productos.
- **NTC 2312.** 1985. Industrias agrícolas. Muestreador de café. Contiene características del material, fabricación y gráfica explicativa del muestreador de café.
- **NTC 4806.** 1999. Café de consumo. Establece los requisitos y los métodos de ensayo que debe cumplir el café consumo obtenido de la trilla de café.
- **NTC 3534.** 2007. Café tostado, en grano o molido. Esta norma establece los requisitos y los métodos de ensayo que debe cumplir el café tostado, en grano o molido.

5.3. ANTECEDENTES

Levi, (1974) analizaron 335 muestras de granos de café verde por su contenido de algunas micotoxinas, y un total de 22 tenían una cantidad detectable de OTA a un nivel cercano al límite de detección del método analítico empleado (aproximadamente 20 μ /kg), las muestras positivas varían de 20 a 360 μ /kg. El Laboratorio Analítico de Micotoxinas de la FDA en Nueva Orleans analizó 201 muestras de café verde en 1980, y dos muestras fueron contaminadas por OTA a un nivel de 96 y 24 μ /kg, respectivamente (Levi, 1980). Se encontró OTA en nueve de 40 muestras comerciales de café verde a un nivel de 0-5-23 μ /kg (Cantafora, Grossi, Miraglia y Benelli, 1983), también Tsubouchi, Yamamoto, Hisada y Sakabe (1984) informaron esta toxina a un nivel de 9,9 – 46 μ /kg en cuatro de 22 muestras de granos de café verde importados.

Los investigadores Studer, Dietrich, Schlatter y Schlatter (1995) trabajaron con granos de café verde y se detectó OTA en 13 de las 25 muestras comerciales analizadas (límite de detección, 0.5 μ g/kg). El tostado (250°C, 150 seg) de almendras verdes naturalmente contaminadas o almendras inoculadas con *A. ochraceus* solo produjo una pequeña reducción en el nivel de OTA. La toxina

también se descubrió que se eluía en la infusión. De 40 infusiones de café preparadas a partir de muestras comercialmente disponibles, se detectó OTA en 18 infusiones por HPLC y/o limpieza adicional de la columna de inmunoafinidad en el intervalo de 0,4 a 7,8 µg/kg. Los resultados preliminares sugieren, por lo tanto, que el consumo regular de café puede contribuir a la exposición de los humanos a OTA.

Romani, Sacchetti, Chaves, Pinnavaia y Dalla (2000) llevaron a cabo determinaciones para evaluar el nivel de contaminación por OTA en muestras de café verde de diferente procedencia. Un total de 162 muestras de granos de café verde de varios países (84 de África, 60 de América y 18 de Asia) se analizaron para OTA. Tanto la cantidad como la variabilidad de los niveles de OTA se probaron en función de la procedencia del café verde. Los resultados mostraron que 106 de las muestras generales fueron positivas para OTA, con una concentración que va de 0 a 48 µg/kg (ppb). En particular, fue posible verificar que las muestras africanas estaban más contaminadas con respecto a las muestras de otro origen en términos de frecuencia y nivel de OTA; las concentraciones más altas observadas fueron 18 y 48 µg/kg en dos muestras de Congo.

En la investigación realizada por Urbano *et al.* (2001) reportaron un alto nivel de contaminación (100%) en los granos de café estudiados, con el género *Aspergillus* representando 33.2%, de los cuales *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus niger* representaron 10.3 y 22.9%, respectivamente, de las cepas aisladas del grano de café. La capacidad de producir ocratoxina se determinó en 155 cepas de *A. ochraceus* y *A. niger* utilizando tanto el método del tapón de agar como la extracción con cloroformo, dando resultados positivos para el 88.1% de las cepas de *A. ochraceus* y el 11.5% de las cepas de *A. niger*. El análisis de OTA en las muestras de café en terraza y granero mostró que, independientemente del cultivar, año cosechado o región de producción, todas, excepto una de las muestras analizadas, mostraron niveles de micotoxinas por debajo del límite sugerido por el Mercado Común Europeo (5 µg/kg). Lo que indica que el problema es debido a fallas severas en las prácticas de cosecha y almacenamiento.

Blanc, Vuataz y Hilckmann (2001) reportaron el transporte de café crudo a granel o bolsas, en contenedores donde la condensación se registró en la parte superior del contenedor, por ejemplo en un puerto europeo en invierno. La aparición de áreas con alta humedad favorece el crecimiento y la formación de OTA como se discutió anteriormente. Las pruebas de almacenamiento y transporte han demostrado que la condensación y la humectación del café se producen principalmente durante el transporte por tierra hasta el puerto para el envío y/o al llegar al destino. Además, en un estudio realizado por Palacios *et al.*, (2007) investigaron la producción de OTA durante el transporte y verificaron que la temperatura dentro de los recipientes de café, la cual cambió drásticamente durante el viaje de un país exportador de café, como Brasil (en verano) a un país importador como Italia (en invierno). Esto indujo condensación en la parte superior de los contenedores, causando un aumento en MC de 12.26 a 14.13% (peso seco) y llevó a la formación de OTA de 0.1 a 7.91 µg

kg-1 en los granos de café en la parte superior del contenedor ubicado en la cubierta al final del viaje.

En otros estudios realizados por Taniwaki *et al.*, (2002) en café del Brasil encontraron que *A. niger* fue la especie más común (63% de los aislados), pero solo el 3% de ellos produjo OTA. *A. ochraceus* también se presentó comúnmente (31% de los aislamientos), y el 75% de los estudiados fueron capaces de producir OTA, un porcentaje mucho más alto que el reportado en otros lugares. Se encontró *A. carbonarius* (6% de los aislamientos) solo en Alta Paulista, la región más cálida estudiada, y en el patio de secado o en almacenamiento. Sin embargo, el 77% de los aislamientos de *A. carbonarius* fueron capaces de producir OTA. Las tasas promedio de infección para las cerezas tomadas de los árboles fueron muy bajas, pero fueron más altas en la fruta tomada del suelo, del patio de secado y del almacenamiento, lo que indica infección por especies toxigénicas después de la cosecha. El contenido promedio de OTA en 135 muestras de cerezas maduras de árboles, demasiado maduras de árboles, sobremaduras del suelo, patio de secado y almacenamiento fue 0.1, <0.2, 1.6, 2.1 y 3.3 µg/kg, respectivamente. Aunque los niveles individuales de OTA variaron ampliamente, solo 9 de las 135 muestras analizadas excedieron los 5 µg/kg de OTA, con una muestra de café seco de baja calidad por encima de 100 µg/kg. Las causas de la alta contaminación se investigaron en las fincas afectadas y se encontraron varios puntos críticos relacionados con las condiciones climáticas locales y los procesos de secado utilizados.

Estudios en países como Tailandia, durante el 2006 y el 2007, fueron tomadas 32 muestras de grano de café tailandés seco (*Coffea arabica*) en dos localidades de Chiang Mai Provincia, y 32 muestras de café tailandeses secos (*Coffea canephora var. robusta*) en dos localidades de Chumphon Provincia, Tailandia, fueron recogidos y evaluados para la distribución de los hongos con el potencial de producir Ocratoxina A (OTA). De las 64 muestras del grano de café analizados, el 98% estaban contaminadas con OTA en los niveles de 0.6-5.5 mg / kg (Arábica) y 1.27 mg / kg (robusta). La presencia de Ocratoxina A en muestras de café también fue confirmado por LC-MS/MS después de la purificación de intercambio iónico (Noonim, Mahakarnchanakul, Nielsen, Frisvad y Samson, 2008).

Las investigadoras Tozlovanu y Pfohl-Leszkowicz (2010) en su estudio determinaron que las recuperaciones de OTA de las bebidas preparadas fueron similares con todos los métodos (75-80%). Todas las muestras que contenían OTA variaron desde trazas a 11.9 µg/kg. Alrededor del 20 al 140% de OTA pasó a través de las bebidas. Las recuperaciones de más del 100% de OTA en bebidas se debieron a tres tipos de interferencias: (i) formación de OTA de anillo abierto (OP-OA) durante la extracción alcalina, (ii) isomerización de OTA durante el tostado, y (iii) presencia de OTA el OTB análogo no clorado. Los dos primeros tipos de interferencia generan derivados de OTA que no son reconocidos por los anticuerpos de OTA, mientras que OTB reacciona de forma cruzada con los anticuerpos de OTA.

Estos problemas analíticos afectarán seriamente la cantidad de OTA detectada, especialmente a niveles cercanos a los límites de la legislación de la UE. La subestimación de la OTA podría ser muy peligrosa para la salud.

En un estudio realizado en México por Trigos, Luna y Lozada (2010) encontraron que el 100% de las muestras analizadas de café verde, se encontraba contaminada con *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. productores de OTA, y el 100 % de las muestras de café analizadas presentaron concentraciones de OTA por debajo de los límites permitidos por la normatividad mexicana (1.2 a 7.7 ppb). En otro estudio realizado por Quiroz *et al.* (2004) se reportó que los niveles de contaminación encontrados en los procesos de café fueron 80, 72 y 92%, respectivamente, para el café pergamino, cereza seco y café verde respectivamente. *Aspergillus ochraceus* fue aislado de los tres procesos representando un porcentaje de 6.6, 8.3 y 3.3% de los aislamientos totales, y *Aspergillus niger* con un porcentaje de 15, 13 y 25% de las cepas aisladas, respectivamente. El potencial toxigénico de cinco cepas de *A. ochraceus* y dos de *A. niger* se probó en medio FDA y medio de café usando la técnica de HPLC. No hubo diferencia entre los procesos estudiados en términos de aislamiento y ocurrencia de hongos ocratoxigénicos.

Coronel, Marin, Cano, Ramos y Sanchis (2011) determinaron el contenido promedio de OTA en 72 muestras fue 2.17 ± 0.79 ng/g (rango 1.21e4.21 ng/g, 49% de ocurrencia). Las marcas realizaron un muestreo adicional en 45 muestras, la contaminación media por OTA fue 2.07 ± 0.61 ng/g (rango 1.30e5.24 ng/g, 95% de ocurrencia). Los datos de consumo de café se obtuvieron mediante un cuestionario de frecuencia de alimentos. El consumo promedio de café *per cápita* fue 11.58 ± 8.73 g/persona/día. La ingesta diaria (DI) de OTA se estimó mediante métodos determinísticos y probabilísticos. En ambos casos, la DI estimada (alrededor de 0,22 ng/kg/ día).

Recientemente en Colombia se han realizado estudios sobre la micobiota naturalmente asociada a granos de café y sobre la presencia de especies toxígenas en dicho producto; en una investigación se tomaron muestras de 5.000 granos de café en diferentes estadios de su procesamiento, encontrando que taxones fúngicos potencialmente toxígenos, tales como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, son comúnmente encontrados en todos los estadios del procesamiento de café (Gaitán, 2012). El estudio incluyó muestras desde el fruto en el árbol hasta café tostado y empacado listo para la venta en supermercados. Los resultados muestran que la distribución de estos hongos no es al azar entre los diferentes pasos en el procesamiento del café, lo que significa que algunas etapas son más vulnerables a la infección con hongos que otros. Se discute la conveniencia de establecer un programa dedicado a la detección de hongos o micotoxinas en Colombia y las implicaciones de esto en la salud pública.

Benites *et al.*, (2017) determinaron que la presencia de OTA de muestras de café molido y tostado las cuales variaron entre 95.5 y 109.8%. Los límites de detección

y cuantificación en café fueron 0.266 y 0.500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. El resultado en la contaminación por OTA indica que hubo ligeras diferencias entre las muestras de café arábica y robusta de diferentes orígenes. La media de contaminación por ocratoxina A detectada en el café del mercado portugués fue de 1,84 y 1,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el café tostado y molido, respectivamente; mientras que, se encontró un máximo de 10.31 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estos resultados demuestran cuán importante es el propósito de monitorear y evaluar los niveles de OTA en el café, ya que esta micotoxina se distribuye ampliamente en los alimentos y hasta ahora no se cuenta con metodologías exitosas para prevenir la contaminación del café.

6. METODOLOGÍA

6.1. Recolección de las muestras

Se recolectaron un total de 60 muestras de café de las diferentes etapas de producción en el municipio de Toledo (15 muestras por cada etapa), ubicado en el departamento Norte de Santander 7°18'37"N 72°28'59"O, a 1642 msnm, las muestras de café cereza fueron tomadas directamente de los arbustos, la muestra estaba compuesta por café cereza maduro y verde (aproximadamente 400 g); las muestras de café pergamino fueron tomadas de los desecadores tanto cubiertos como a cielo abierto y de las bodegas de almacenamiento (aproximadamente 400 g); el café tostado y molido fue adquirido en las diferentes empresas tostadoras que se sitúan en el municipio.

Todas las muestras fueron transportadas y almacenadas en cadena de frío y bajo condiciones de asepsia hasta su procesamiento.

6.2. Determinación de Ocratoxina A

Para la determinación de OTA se aplicó el método de inmunoensayo enzimático (ELISA) ROSA *Ochratoxin quantitative test* de la casa comercial *Charm Sciences INC (anexo 1)*; para la preparación de la muestra se pesó 50 g, la cual se disolvió en 100 ml metanol al 70% y se agitó por no más de dos minutos, se tomó 2 ml de la fase acuosa y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min, del sobrenadante se tomaron 100 µl del extracto y se mezclaron con 1 ml del buffer de dilución OCHRAQ, esta mezcla fue clarificada por medio de filtración con filtro Whatman de 0,45 µm.

Del extracto diluido filtrado se tomaron 300 µl y se depositaron en el pocillo de la tira indicadora, la cual posteriormente fue incubada a 45°C por 10 minutos en el *incubador Charm EZ-M*.

Pasado este tiempo se procedió a realizar la lectura de la tirilla indicadora en el equipo de lectura *ROSA-M Reader*, el cual tiene un límite de detección de 2 ppb a 150 ppb. El fundamento de método empleado para la determinación y cunatificación de la OTA se puede observar en el **Anexo 6**.

6.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de OTA en las diferentes etapas de beneficio, fueron evaluados estadísticamente utilizando como herramienta ANOVA de un factor, dicho análisis se realizó con ayuda del programa estadístico *STATGRAPHICS CENTURION 12*.

6.4. Análisis fisicoquímico

Las variables fisicoquímicas se determinaron a cada muestra de las etapas de procesamiento del café, los análisis realizados fueron:

Porcentaje de humedad: se determinó el porcentaje de humedad mediante el uso de una balanza de humedad marca *Precisa modelo MX 60*, en donde se pesó aproximadamente 2 g de muestra, la cual fue sometida a una temperatura de 105°C hasta llevar a peso constante.

A_w y pH: para la determinación de la actividad de agua en las muestras se hizo uso del *HygroPalm* marca Rotronic y se determinó el pH aproximadamente en 5 gramos de muestra disuelta en agua destilada, usando un pHmetro marca *WTW Multi 3430*.

Cada determinación se realizó por triplicado y se tabuló en Microsoft Excel para su posterior tratamiento y análisis estadístico (**Anexo 2**).

6.5. Aislamiento fúngico direccionado a la búsqueda de especies ocratoxigénicas

Se realizó un aislamiento direccionado de especies fúngicas productoras de OTA a partir de las muestras de café que superaron límite máximo de OTA permitido por la Resolución MPS 4506 del 2013 (5 ppb); para la observación del crecimiento fúngico, los granos de café (4 granos) se sembraron en cajas de Petri con PDA (Papa Dextrosa Agar) y Sabouraud Dextrosa, realizando siembras directas sobre la placa y se incubaron a 25°C por 5 días, a partir del crecimiento se realizaron nuevos repiques en placas de PDA con el fin de aislar las cepas presentes en cada muestra; una vez se aislaron de forma pura las cepas se procedieron a conservar en glicerol al 40% y se mantuvieron bajo congelación a -30°C para su posterior uso.

6.6. Selección de cepas con potencial en la producción de OTA

Se realizó un proceso de selección a todos los aislamientos fúngicos en agar Leche de Coco (ALC) y agar Crema de Coco (ACC), se incubaron a 25°C durante 7 días. Luego, el reverso de ACC Y ALC con colonias se expuso a longitudes de onda de luz UV (365 nm) en un ambiente oscuro (Heenan, Shaw y Pitt, 1998). Los aislados productores de OTA tomarían fluorescencia verde - azul característica. Las cepas que produjeron fluorescencia se registraron como cepas con potencial en la producción de OTA. Luego, las cepas seleccionadas se fumigaron con amoniaco al 28% en la oscuridad intensificación de la fluorescencia. Las cepas que mostraron una mayor intensidad de fluorescencia bajo la luz UV de 365 nm se registraron como cepas positivas.

6.7. Caracterización de cepas con potencial en la producción de OTA

Las cepas que resultaron positiva en el proceso de selección fueron caracterizadas macroscópicamente y microscópicamente siguiendo las taxonomías y nomenclaturas propuestas por Visagie *et al.*, (2014), Samson *et al.*, (2014), Visagie *et al.*, (2014) y Pitt y Hocking, (2009) (**Anexo 4**), en cuanto a la identificación de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*; para ello se sembraron los aislados en los medios de cultivos MEA y CYA, se llevaron a incubar a 25°C (MEA), 30°C y 37°C (CYA) por 7 días (**Anexo 3**), pasado este tiempo se realizó medición del diámetro de las colonias y la caracterización macroscópica del reverso y anverso de las mismas, para la de terminación del color se utilizó como guía la tabla de colores de Munsell (2000).

En cuanto a la identificación microscópica se realizó utilizando el método simple de Riddel (1950) para el cultivo de portaobjetos permite que los hongos se estudien prácticamente *in situ* con la menor alteración posible. Los microcultivos fueron sembrados en agar MEA e incubados a 25°C por 5 días, transcurrido este tiempo se prepararon los montajes al microscopio, las estructuras fúngicas fueron teñidas con azul de algodón lactofenol y vistas el microscopio.

6.8. Ensayo preliminar para el biocontrol de cepas potencialmente productoras de OTA

Se realizaron ensayos preliminares para el biocontrol de las cepas seleccionadas como productoras de OTA, para ello se hizo uso de 2 biocontroladores (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 y *Trichoderma harzianum*) suministrados por el cerapio de la Universidad de Pamplona, enfrentándolos en agar leche de coco con cada uno

de las cepas seleccionadas; revelando los resultados con exposición de las placas a luz UV de 365nm.

6.9. Protocolo de extracción de ADN

Para la obtención se partió de una suspensión de conidios en agua destilada, dicha suspensión se inoculó en 100 ml de caldo Czapek y se incubó con agitación en orbital a 25°C durante 4 días el micelio obtenido se filtró a través de un filtro Nital y se lavó con solución salina estéril, con el fin de eliminar el exceso de medio de cultivo y de esporas, el micelio obtenido se desecó a 60°C por 3 días hasta alcanzar un peso constante y se pulverizó en mortero, el polvo de micelio obtenido se guardó a -75°C hasta su uso.

Del micelio seco y pulverizado y previamente secado a 50°C por 2 horas se tomaron 100 mg, los cuales se resuspendieron en 500 µl de buffer de lisis A (Tris-HCl 100mM, EDTA 50mM y NaCl 150mM), luego se adicionaron 80 µl de cada una de las soluciones B (SDS 2%, CTAB 2% y DTT 2%), se lleva a vortex, seguido de calentamiento a 100°C con agua hirviendo por 60 min.

Para la purificación de ADN se realizaron fenolicaciones haciendo uso del Fenol 1:1, seguido de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico; 25:24:1 y por último Cloroformo:Alcohol Isoamílico; 24:1. La precipitación del ADN se realizó con isopropanol, Acetato de sodio 3M, pH: 5.0, seguido de un lavado con alcohol al 70% por último el precipitado se resuspendió en buffer TE.

Alternamente, se utilizó una columna de purificación de ADN de la casa comercial Invitrogen, a la cual se le adicionaron 600 µl del lisado, 250 µl del *buffer de unión Pure Link* y 200 µl de etanol absoluto, para rescatar el ADN retenido por la columna se realizaron dos eluciones seguidas cada una con 50 µl del buffer de elución.

Para evaluar la extracción de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,9%, acondicionado con Safe View, cada muestra se depositó en un pocillo con un volumen final de 20 µl y para determinar el peso aproximado del ADN aislado se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb *opti-DNA marker* (abm), la corrida electroforética se realizó a 80 Vol /1 Hr. Por último, al ADN obtenido de ambos procesos se le determinó la concentración y pureza por espectrofotometría, con ayuda de Nanodrop 2000c.

En la Figura 8 se presenta en forma resumida la metodología utilizada para el desarrollo del estudio.

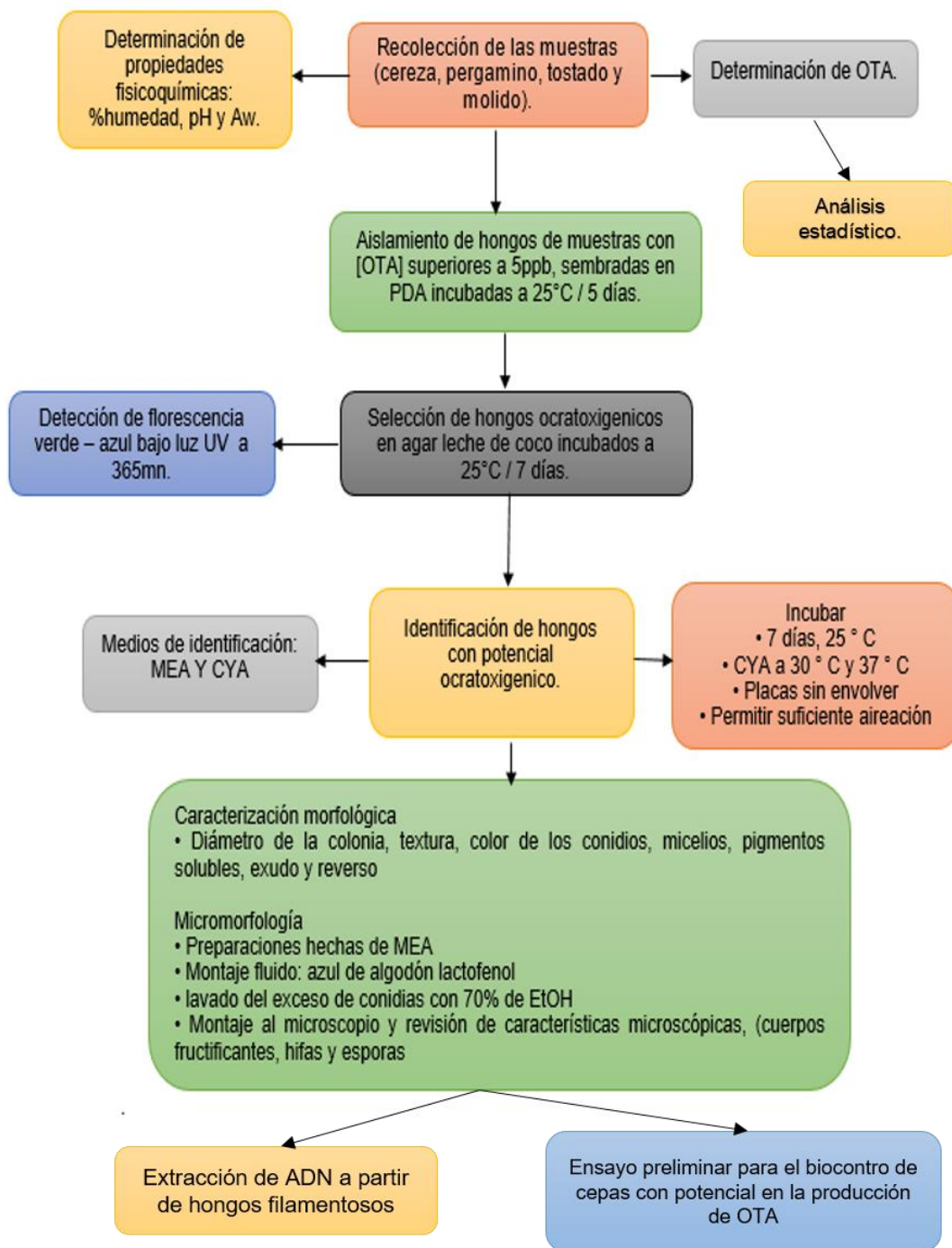


Figura 8: Diagrama de flujo para la metodología.
Fuente: Autor.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación.

Como resultados preliminares se muestran los obtenidos en el ensayo de biocontrol *in-vitro* de hongos Ocratoxigénicos.

7.1. Determinación de la incidencia de OTA en las etapas de beneficio del café.

La OTA muestra una elevada incidencia en todas las etapas de beneficio del café producido en Toledo con un valor de 96,3% para el total de muestras, a su vez se encontraron valores de incidencia del 93,3% para café cereza y pergamino, y un 100% para el café molido y tostado (**Figura 9**), estos resultados se asocian con las condiciones de procesamiento del café las cuales no se controlan adecuadamente permitiendo la contaminación de hongos ocratoxigénico, y producción de OTA en el grano de café, a su vez se muestra la estabilidad de la toxina frente a los diferentes tratamientos a los que son sometidos los granos del café.

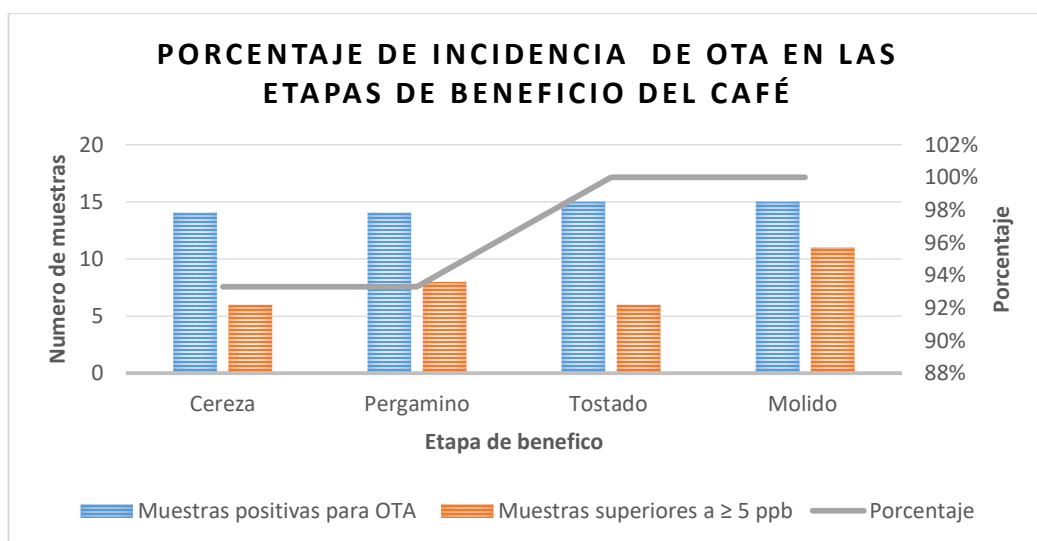


Figura 9: Porcentaje de incidencia de OTA en las etapas de beneficio del café.
Fuente: Autor.

De acuerdo a los resultados anteriores se ratifica que las condiciones bajo las cuales se realiza el beneficio del café, representan un riesgo elevado de contaminación y colonización de hongos Ocratoxigénicos y por consiguiente la producción y contaminación de OTA en el producto, se logró evidenciar que las dos primeras etapas del café son críticas y las más susceptibles a la contaminación, ya que se realizan a ambientes expuestos y no controlados, por ende es normal la contaminación fúngica de tipo ambiental, sumado a esto la etapa de café pergamino es bajo la cual este producto se comercializa como materia prima para la producción de café, y en esta etapa el grano suele almacenarse por largos periodos en bodegas donde el control de variables ambientales no se realiza, lo cual permite el desarrollo de mohos Ocratoxigénicos y producción de la toxina, es por esto que la etapa de café pergamino representa un alto riesgo de contaminación fúngica y toxigénica.

La presencia de OTA en los granos de café puede considerarse en relación con las condiciones de cosecha (Moreas y Luchese, 2003), las condiciones de procesamiento poscosecha (Bucheli *et al.*, 2000; Joosten *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 2000; Suárez, *et al.*, 2005), especialmente durante el secado (Urbano *et al.*, 2001; Moreas *et al.*, 2003; Suárez, *et al.*, 2005), almacenamiento y transporte (Bucheli *et al.*, 1998). En la literatura, la cuantificación de OTA se llevó a cabo generalmente en cafés muestreados después del procesamiento (Urbano *et al.*, 2001). Este café siempre contiene proporciones variables, dependiendo de la calidad de los factores culturales y tecnológicos de producción. Por otro lado, no se realiza cuantificación de OTA en las muestras tomadas antes del procesamiento, suponiendo que la contaminación por OTA se produce solo durante el procesamiento. Recientemente se ha detectado OTA en cerezas frescas a niveles ocasionalmente altos (45 ppm).

El tiempo de invasión del café por hongos toxigénicos no se ha investigado adecuadamente. Esto es de gran importancia para comprender el problema de la OTA en el café y desarrollar estrategias de control. La experiencia con otros cultivos ha demostrado que si la invasión ocurre antes de la cosecha, el control será mucho más difícil que si ocurre después de la recolección, es decir, durante el secado y el almacenamiento. Se puede esperar que los problemas posteriores a la cosecha se relacionan con climas desfavorables para el secado, malas prácticas de secado o control de calidad, o condiciones de almacenamiento inadecuadas (Taniwaki, Pitt, Teixeira y Lamanaka; 2003).

Una vez que se ha formado la OTA, normalmente sobrevive a la mayoría de las etapas de procesamiento de alimentos, como cocción, fermentación y tostado, como en el caso de los granos de café. En el análisis tostado del café dio los resultados más variables en términos de estabilidad de OTA ya que se informaron pérdidas en la concentración de OTA en el rango de 0 - 100% (Vatinno *et al.*, 2008) demostrando así que ni el proceso de tostado el cual se realiza a elevadas temperaturas (superiores a 190°C) logran eliminar por completo esta micotoxina.

7.2. Determinación de la concentración de OTA y propiedades fisicoquímicas en el grano del café en las etapas de beneficio.

Los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de OTA en las diferentes etapas de beneficio del café producido en Toledo, Norte de Santander fueron tratados estadísticamente para determinar si la etapa de beneficio tiene alguna influencia directa en la concentración de OTA que en ella se encuentra, para ello se realizó ANOVA de un factor, en donde se enfrentaron las concentraciones de la toxina (variable dependiente) con las etapas de beneficio (factor). A continuación se explica el modelo estadístico utilizado.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + E_{ij}$$

Y_{ij} : Significa el valor observado.

μ : Representa la media total.

α_i : Hace referencia al efecto que tiene el factor (etapa de beneficio) sobre la concentración de OTA.

E_{ij} : Representa el error aleatorio o residuo.

De acuerdo con lo presentado en la Tabla 3, no existen diferencias estadísticamente significativas, ya que el valor P es mayor al nivel de significancia (0,05) lo cual determina que no hay diferencias en la media de la concentración de OTA entre las diferentes etapas, por ende no se rechaza la hipótesis nula.

Tabla 3: ANOVA para [OTA] ppb por Etapa.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	45,1333	3	15,0444	1,25	0,2993
Intra grupos	672,267	5	12,0048		
Total (Corr.)	717,4	5			
		9			

Fuente: Autor.

El resultado anterior se comprueba realizando la comparación a nivel de medianas de las concentraciones de OTA por etapa de beneficio.

La prueba de medianas de Mood (**Tabla 4**) evalúa la hipótesis de que las medianas de todas las 4 muestras son iguales. Lo hace contando el número de observaciones en cada muestra, a cada lado de la mediana global, la cual es igual a 5,0. Puesto que el valor-P para la prueba de chi-cuadrada es mayor o igual a 0,05, las medianas

de las muestras no son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95,0%. También se incluyen (si están disponibles) los intervalos del 95,0% de confianza para mediana, basados en los estadísticos de orden de cada muestra.

Tabla 4. Prueba de la Mediana de Mood para [OTA] ppb por Etapa de beneficio

Etapa de beneficio	Tamaño de Muestra	$n < =$	$n >$	Mediana	LC inferior 95,0%	LC superior 95,0%
cereza	15	11	4	4,0	1,0	6,82183
molido	15	6	9	6,0	4,0	8,0
pergamino	15	8	7	5,0	1,17817	8,64366
tostado	15	12	3	4,0	2,17817	5,82183

Estadístico = 6,41598 Valor-P = 0,0930334

Fuente: Autor.

A continuación se muestra el gráfico de cajas y bigotes (**Gráfico 10**) en donde se plasman los resultados obtenidos en cuanto a las concentraciones de OTA en cada etapa de beneficio, en este gráfico se muestra el límite inferior, límite superior, mediana y media de la concentración de OTA por etapa de beneficio.

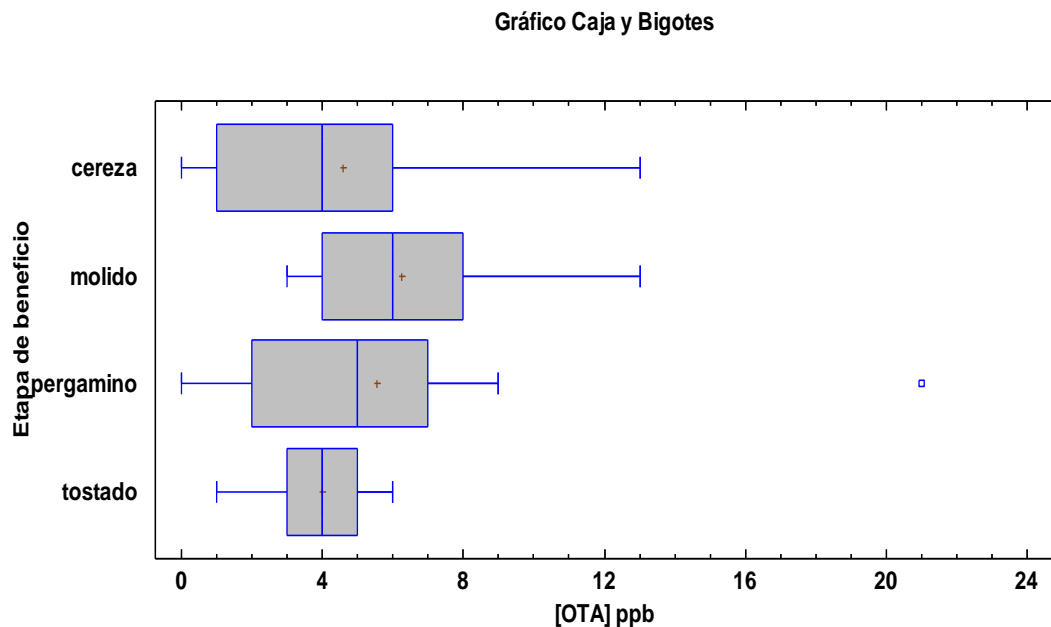


Figura 10. Gráfico de caja y bigotes concentración de OTA Vs etapa de beneficio.

Fuente: Autor.

En las etapas café pergamino y café molido, la concentración de la toxina superó el límite máximo de 5 ppb establecido por el MPS en la Resolución 4506 del 2013, encontrando valores de 5,53 ppb y 6,27 ppb, respectivamente (**Figura 10**).

En un estudio realizado por Micco y colaboradores (1989) en el cual estudiaron 29 muestras de café verde, encontraron un porcentaje de contaminación significativamente alto (58%) que oscilaba entre 0,2 y 15 µg/kg. Las muestras contaminadas natural y artificialmente y que fueron tostadas en diferentes tiempos de operación (5-6 min) para verificar el porcentaje de destrucción de la micotoxina. Arrojó como resultado que el porcentaje varió de 48% a 87% y de 90% a 100% en muestras contaminadas artificial y naturalmente, respectivamente.

Teniendo en cuenta que la contaminación del café por hongos micotoxigénicos, se presenta cuando este se procesa, almacena y transporta bajo condiciones desfavorable, alterando así las propiedades fisicoquímicas propias del grano, las cuales determinan si el hongo puede o no desarrollarse en dicha matriz; los resultados de la determinación del pH, Aw y porcentaje de humedad en las muestras analizadas presentan diferencias estadísticas significativas (**Anexo 5**) estos resultados dados por el ANOVA, a su vez las propiedades fisicoquímicas analizadas indican que solo en las etapa de café cereza y café pergamino presentan las condiciones aptas para el desarrollo de mohos y la producción de sus toxinas (**Figura 11**), en estas etapas el grano presenta las condiciones físicas y químicas que permiten el desarrollo del hongo y la producción de la toxina en el grano de café.

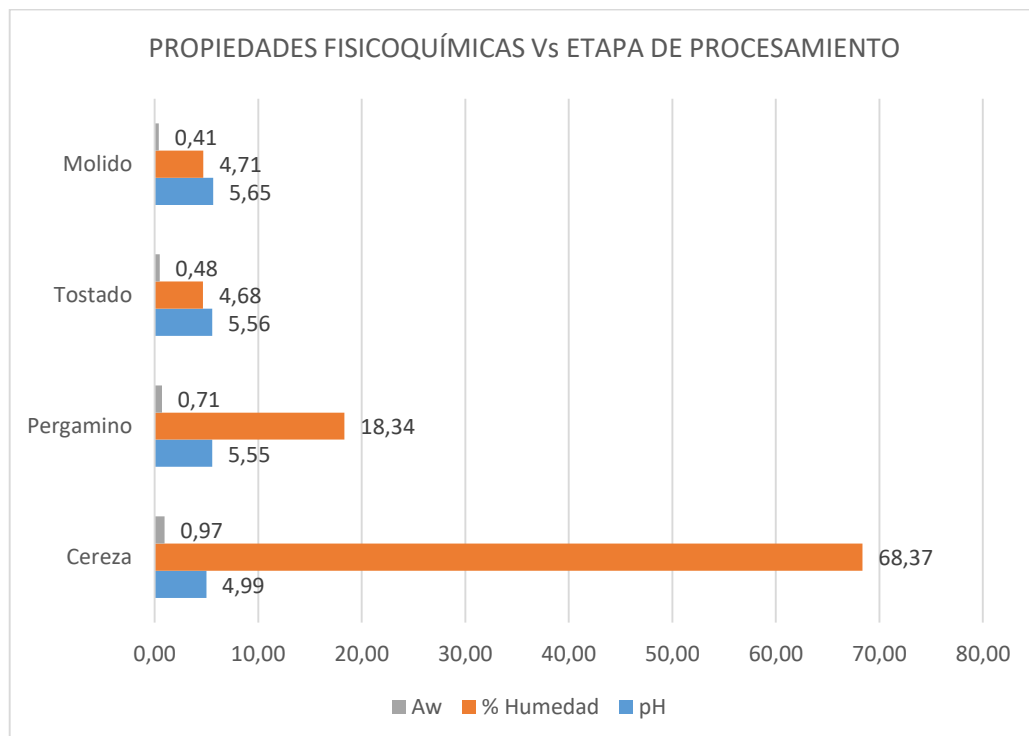


Figura 11. Propiedades fisicoquímicas por etapa de procesamiento.
Fuente: Autor.

La mayoría de los hongos se desarrollan a partir de valores de A_w de 0,70, en general es raro que haya hongos que germinen con valores de A_w entre 0,60 y 0,70; la influencia del factor A_w en el metabolismo de las micotoxinas solo está suficientemente estudiada para las Aflatoxinas, Ocratoxina, ácido penicílico y Patulina. Sin embargo, la producción de micotoxinas es nula o muy baja con A_w inferior a 0,85 y no obstante el crecimiento de mohos toxigénicos ya se puede producir en un intervalo de A_w de 0,70-0,85 (Quintana, 1982).

Aunque el valor porcentual de humedad de un alimento solo da una orientación para juzgar las posibilidades de crecimiento y multiplicación de los hongos, se dice que valores de humedad inferiores al 13% suelen presentar un crecimiento y proliferación fúngica bajo y a medida que la humedad aumenta, el crecimiento y proliferación fúngica se aceleran, pudiendo ser de forma exagerada para valores de humedad del 16% (Gimeno, 2002).

Los hongos toleran un gran intervalo de pH (2,5 - 7,5), de un modo general soportan mejor el medio ácido que el alcalino. Es de destacar que ellos mismos son capaces de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los ácidos orgánicos del alimento (Quintana, 1982).

Varios autores como Pitt y Hocking (2009) y Frisvad y Samson (1991), han registrado que el hongo *Aspergillus ochraceus* crece entre 8 y 37°C, y valores de actividad de agua (A_w) entre 0,76 y 0,99. Las condiciones óptimas de crecimiento del hongo son 24 a 31°C, 0,95 y 0,99 de A_w , y pH entre 3 y 10. De otra parte, la Ochratoxina A es producida por *Aspergillus ochraceus* aun para valores de A_w entre 0,83 y 0,87, y en algunos casos, para valores cercanos a 0,8 (Frisvad y Samson, 1991).

Debido a que el café es un material muy higroscópico, a menudo puede reabsorber la humedad del medio ambiente durante el almacenamiento y el transporte. Palacios *et al.*, (2003) demostraron que las fluctuaciones de temperatura de 80, 87 y 95% de humedad relativa (HR) afectaron los niveles de contaminación por OTA en el café crudo.

Por lo tanto, el ciclo de las condiciones ambientales puede favorecer indirectamente la producción de OTA debido a la condensación y reabsorción de agua por los granos de café. Esto podría ser particularmente importante durante el transporte, donde se crea un control efectivo de las condiciones para mantener el contenido umbral de humedad (12-13%) para evitar el sabor perjudicial y minimizar el riesgo de contaminación por OTA (Magan y Aldred, 2005).

7.3. Aislamiento y selección de hongos con potencial ocratoxigénico.

De las 60 muestras de café analizadas (15 muestras por cada etapa), se encontró que un total de 31 (51,6%) superaron el límite de 5 ppb establecido en la resolución MPS 4506 de 2013, el cual se encuentra establecido en la Resolución de Ministerio de Protección Social 4506 del 2013; en todas las etapas de beneficio del café se evidenciaron concentraciones superiores a esta, en la etapa de café cereza, 6 muestras superaron este límite, para el café pergamino, 8 muestras, en el café tostado, 6 y en el café molido, 11 (**Figura 9**) en porcentajes representan una equivalencia de 40%, 53,3%, 40% y 73,3%, respectivamente (**Anexo 1**); a partir de estas muestras se realizó el aislamiento de hongos, obteniendo como resultado un total de 57 aislamientos; todo los hongos aislados pertenecieron los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* según las claves taxonómicas de Pitt y Hocking (2009) y taxonomías y nomenclaturas de Visagie *et al.* (2014) y Samson *et al.* (2014), géneros dentro de los cuales se encuentran especies capaces de producir esta toxina.

En estudios realizado por Quiroz *et al.* (2004) se evaluaron tres procesos de café (procesos húmedos, mecánicos y secos), en diferentes etapas desde la cosecha hasta el almacenamiento, y se enumeraron e identificaron los hongos que producen OTA. Encontrando en los procesos de café un porcentaje de contaminación de 80, 72 y 92% para el café pergamino y cereza seca, respectivamente y de 20, 34 y 15% para el café verde. *Aspergillus ochraceus* fue aislado de los tres procesos, representó un porcentaje de aislamiento de 6.6, 8.3 y 3.3%, y *Aspergillus niger* un porcentaje de 15, 13 y 25% con respecto a las cepas aisladas.

También hay informes de Frisrad *et al.* (2004) donde se reporta la producción de OTA por *Aspergillus* amarillos. Mencionando los géneros *Aspergillus cretensis*, *Aspergillus flocculosus*, *Aspergillus neobridgeri*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus pseudoelegans*, *Aspergillus roseoglobulosus* y *Aspergillus westerdijkiae*. Leong *et al.*, (2007) reportan que los granos de café Robusta se infectaron con más hongos que con el café Arábica. *Aspergillus niger* infectó el 89% de los granos de Robusta, mientras que *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus* amarillos cada uno infectaron 12-14% de los granos de café. La OTA no fue producida por *A. niger* el cual tuvo un total de 98 aislamientos, *A. ochraceus* con 77 aislamientos, pero se detectó en 110 de 113 aislamientos de *A. carbonarius*, 10 aislamientos de *A. westerdijkiae* y un aislado de *A. steynii*.

En diferentes estadios del procesamiento del café, se han reportado taxones fúngicos potencialmente toxigénicos, tales como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, los comúnmente encontrados en todos los estadios del procesamiento de este producto, en Colombia no hay estudios sobre la microbiota naturalmente asociada a los granos de café, ni sobre la presencia de especies toxigénicas en dicho producto (Gaitán, 2012).

Las condiciones propias de cada etapa en cuanto al proceso hacen posible la contaminación por hongos, ya que estamos hablando de un proceso cultural y poco tecnificado en donde no se es posible el control de las variables fisicoquímicas que permiten el desarrollo fúngico, a su vez en el beneficio del café solo existe una etapa (torrefacción o tostado) donde se logra la eliminación de estructuras fúngicas; pero en el resto del proceso la materia es muy susceptible a la contaminación; por lo cual es muy común la contaminación fúngica sobre todo en las etapas de café cereza y pergamino.

Los 57 aislamientos fueron inoculados en agar leche de coco, agar crema de coco y agar Czapek, para poder seleccionarlos por emisión de fluorescencia bajo luz UV a 365 mn. Como resultado se obtuvo que el mejor medio para la selección de hongos con potencial ocratoxigénico fue el agar leche de coco, en comparación con el agar crema de coco y Czapek.

El agar crema de coco contiene una elevada concentración de grasas (20% aproximadamente), convirtiendo así este medio en un medio con baja disponibilidad de agua, en donde el desarrollo fúngico fue muy poco y por ende la producción de toxina también, en este medio sólo se logró evidenciar la fluorescencia en una de las cepas, al igual que en el agar Czapek en donde al contrario del medio crema de coco, permitió un buen desarrollo fúngico, pero no una buena producción de fluorescencia.

El agar leche de coco mostró tener las condiciones apropiadas para el desarrollo fúngico y la producción de OTA, en este medio la emisión de fluorescencia fue mayor e intensa (**Figura 12**), del total de la cepas aisladas (57 aislamientos), 10 cepas fueron seleccionadas como productoras potenciales de OTA representando un porcentaje de 17,54% del total de cepas aisladas; unas con mayor potencial que otras pero todas las cepas fueron capaces de producir fluorescencia de color verde-azul al ser expuestas a la luz UV de 365 mn (**Tabla 5**).

Tabla 5: Intensidad de la fluorescencia emitida por los hongos seleccionados en agar leche de coco.

AISLAMIENTO	ETAPA	INTENSIDAD DE LA FLUORECENCIA	[OTA] ppb
T069-2	Tostado	++	ND
T069-1	Tostado	+++	10
T040	Cereza	++	ND

T066	Tostado	+	ND
T051-2	Molido	+++	ND
T048-2	Molido	+	ND
T031-2	Pergamino	++	ND
T037-3	Cereza	++	ND
T031-1	Pergamino	+	ND
T051-1	Molido	+++	15
<i>A. brasiliensis</i>	Control negativo	-	ND

+++ : Fluorescencia fuerte, ++ : fluorescencia media, + : fluorescencia débil, - : no fluorescencia, ND : no determinada.

Fuente: Autor.

En la Tabla 5 se muestra que los aislamientos con una mayor intensidad en la fluorescencia fueron T051-1, T051-2 y T069-1; los demás aislamientos presentaron una intensidad de la fluorescencia media o débil indicando que son cepas medianamente o débilmente productoras de OTA; se lograron seleccionar cepas con potencial ocratoxigénico en todas las etapas de beneficio del café, las cepas fueron aisladas mayoritariamente de las etapas del café molido y tostado (cada una con 3 aislamientos), seguido por café pergamino y cereza (cada una con dos aislamientos).

Este método de selección fue usado por Xiaoyun *et al.*, (2016), en donde lograron seleccionar por fluorescencia 5 especies toxigénicas aisladas de uvas, de las cinco cepas, hay dos especies de *Penicillium*, dos especies de *Talaromyces* y una especie de *Aspergillus*, la producción de OTA fue confirmada por HPLC-FLD, conteniendo como resultado concentraciones que van desde los 25.9 ng/g hasta los 97.5 ng/g.

También Sumanee y Angsana, (2015) utilizaron esta técnica para seleccionar especies de *Aspergillus* productoras de OTA en granos de café. Obteniendo como resultados la selección de un total de 12 cepas capaces de generar fluorescencia bajo la luz UV, *Aspergillus* ocratoxigénicos fueron comunes en el café pergamino; Según este estudio las especies dominantes fueron *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus ostianus* las cuales lograron producir OTA. Heenan *et al.*, (1998) han reportado previamente que la producción de OTA produjo una fluorescencia verde azul que generalmente cubre la colonia en agar crema de coco. Así como Mantle y Chow (2000) informaron que los aislamientos de café asiáticos produjeron ocratoxina A con un rango de 400 mg kg⁻¹, en agar de coco la OTA aparece como una intensa fluorescencia azul-verde.

Las propiedades de emisión de OTA provienen de un proceso de transferencia de protones intermoleculares en estado de excitación (ESIPT) que depende de una estructura de estado fundamental que tiene enlaces H intermoleculares entre el protón fenólico y los grupos carbonilo vecinos (Frenette *et al.*, 2008).

Las placas con fluorescencia fueron rociadas con amoniaco al 28% y todas mostraron un aumento en la intensidad de la fluorescencia por unos segundos, luego esta se desvaneció por completo (**Figura 12**), dicho método fue usado por Xiaoyun *et al.*, (2016), para confirmar la presencia de la OTA en el medio leche de coco.

Para la confirmación de la producción de OTA en el medio leche de coco, se seleccionaron dos cepas con mayor intensidad de fluorescencia, las cuales fueron T051-1 y T069-1, estas fueron inoculadas en agar leche de coco por triplicado, e incubadas a 25°C/7días, una vez se detectó la fluorescencia bajo luz UV, se procedió a realizar el protocolo de extracción de la OTA recomendado por ROSA Ochatoxin cuantitative casa comercial Chram, determinando la concentración de esta toxina por inmunoensayo, logrando así confirmar cuantitativamente la producción de OTA, obteniendo como concentraciones 10 ppb y 15 ppb para T069-1 y T051-1, respectivamente (**Tabla 5**).

Sumanee y Angsana, (2015) probaron tres grupos de *Aspergillus* los cuales fueron amarillo, negro y verde para determinar preliminarmente la producción de OTA en ALC. Los resultados mostraron que 12 aislamientos de *Aspergillus* produjeron fluorescencia verde o azul en el medio ALC. La cual fue confirmada usando el método HPLC y tapón de agar de extracto de levadura + sacarosa (YES). En los doce aislamientos de *Aspergillus* se detectó la producción de OTA. *Aspergillus ochraceus* produjo niveles de OTA superiores a 12.937,50 ng/g. También Chen *et al.*, (2013) informaron que *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glycyrrhizicola*, *Penicillium polonicum*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus westerdijkiae* podrían producir OTA, la concentración varió entre los aislados de 12.99 a 39.03 µg/kg. Un trabajo similar ha reportado una alta producción de ocratoxina A (400-16,000 µg/kg) en granos como trigo, centeno y cebada, lo que demuestra que algunos aislamientos de *Aspergillus ochraceus* son altos productores de esta toxina (Kononenko *et al.*, 2000).

A continuación se muestra la figura 12 en donde se evidencia la fluorescencia emitida por las cepas aisladas al ser expuestas a luz UV 365nm, dicha característica es otorgada por la posible producción de OTA.

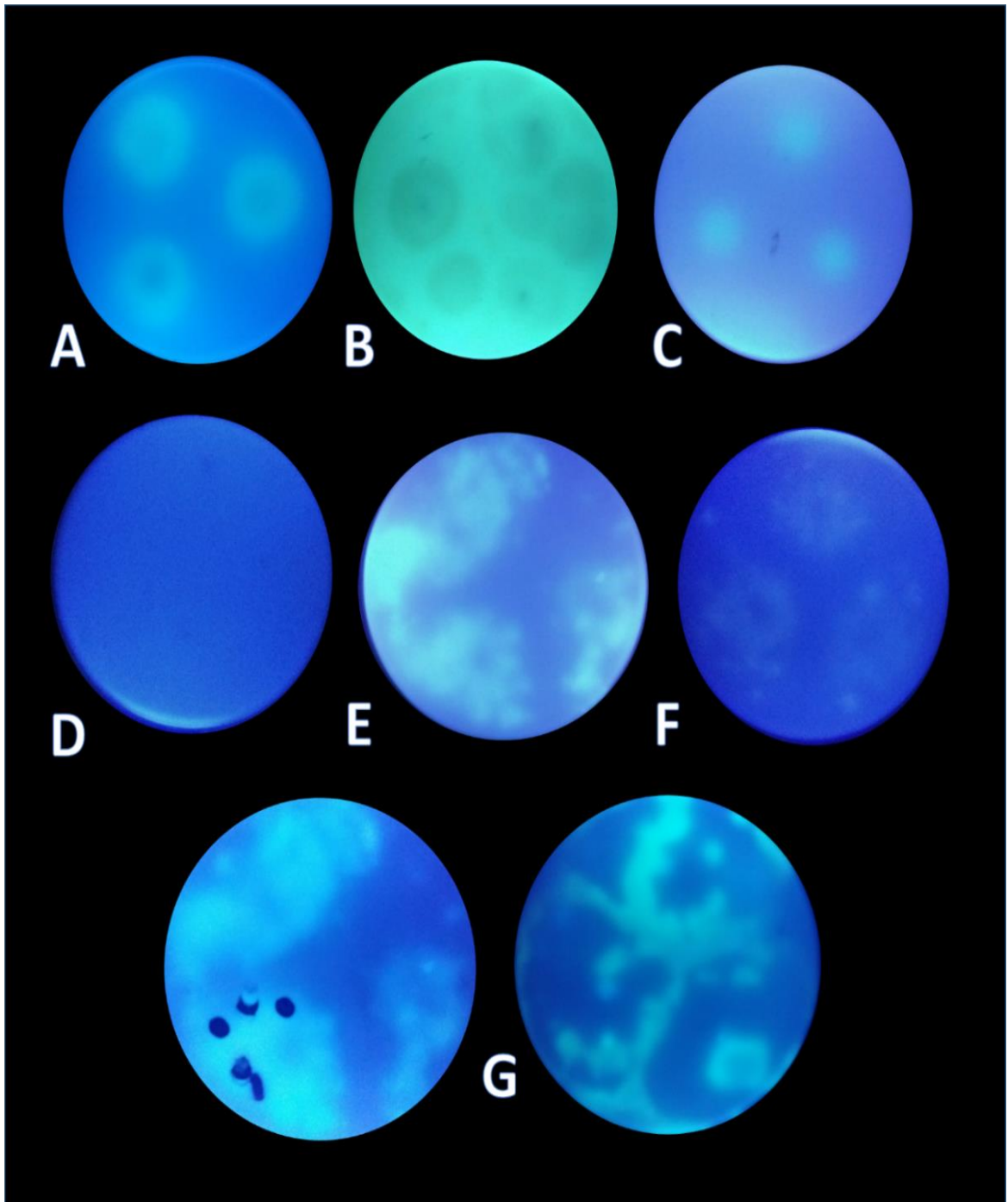


Figura 12. Selección de hongos potencialmente productores de OTA en agar leche de coco y fluorescencia emitida por exposición UV 365nm. A, B, C, E, y F: fluorescencia emitida por la OTA, D: control negativo (*A. brasiliensis*) y G: fluorescencia intensificada al rociar amoníaco al 28%.

Fuente: Autor.

7.4. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas seleccionadas.

Se realizó la caracterización de las cepas con potencial producción de OTA, para clasificarlas a nivel de género, y verificar si pertenecen a los géneros que en literatura producen esta toxina, esta caracterización se realizó siguiendo los criterios de clasificación y metodologías propuestas por Pitt y Hocking (2009) y taxonomías y nomenclaturas de Visagie *et al.*, (2014) y Samson *et al.*, (2014), las características propias de cada hongo fueron evaluadas en los medios MEA (incubado a 25°C), y CYA (incubado a 30 y 37°C) se evaluó el reverso de las placas anotando el diámetro de la colonia, color, y liberación de pigmentos; para el anverso de las placas se registraron características como color y forma de la colonia, textura, producción de exudados. En cuanto a la caracterización microscópica de las cepas seleccionadas con potencial producción de OTA, se registraron características como cuerpo fructificante, hifas y esporas; todas las características fueron fotografiadas para guardar respaldo de la caracterización.

La caracterización de las cepas seleccionadas guarda particular importancia dentro del desarrollo de este trabajo ya que estas cepas se van a identificar molecularmente y estas anotaciones respaldan los estudios de identificación molecular ya que la Microbiología tradicional siempre estará atada a las pruebas de identificación molecular.

Las cepas T037-3, T066, T051-2 y T069-1, presentaron la misma morfología macroscópica en los medios MEA y CYA, indicando que se trataba del mismo hongo; en medio MEA presentó las siguientes características: **Reverso**: colonia color beige, diámetro de 40 mm y sin liberación de pigmentos; **Anverso**: colonias color verde oliva claro, surcadas, con producción de exudados color amarillo pálido, y textura aterciopelada (**Figura 13: A, B y C**); en medio CYA 30°C se presentaron las siguientes características: **Reverso**: colonias color oliva, diámetro de 23 mm, sin liberación de pigmentos; **Anverso**: colonias verde oliva con formación de surcos, sin presencia de exudados, de textura aterciopelada (**Figura 13: D, E y F**); en medio CYA 37°C no se presentó crecimiento. En cuanto a la descripción microscópica se observó un conidióforo terverticilado, con hifas septadas hialinas gruesas y esporas redondas sin ornamentos, de pared gruesa y color verde oliva (**Figura 13: G, H, y I**). Según la descripción macro y microscópica la cepa pertenece al género *Penicillium cf.* (Visagie *et al.*, 2014), la especie está por confirmar molecularmente.

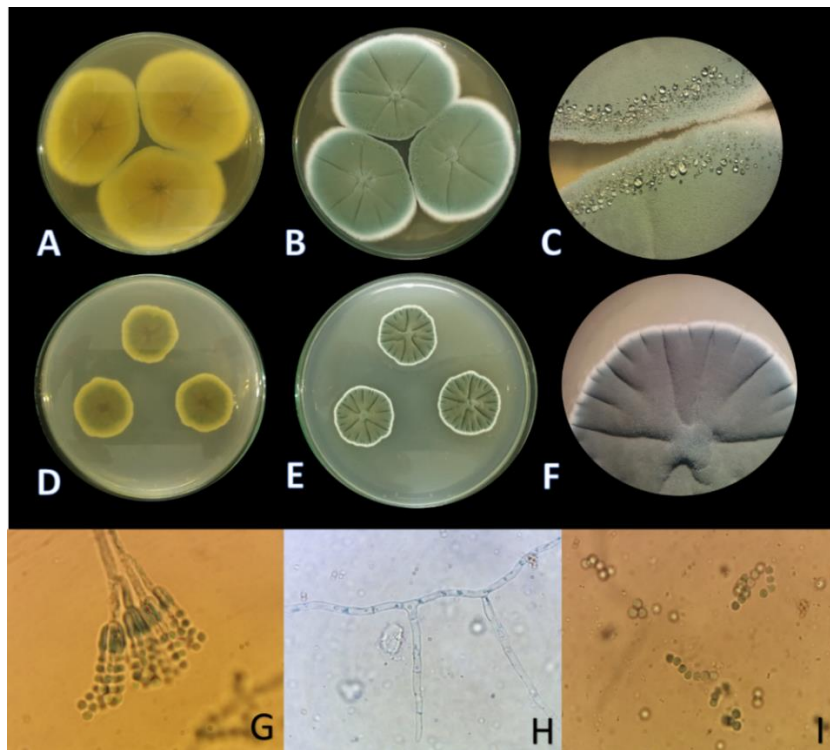


Figura 13: Caracterización macroscópica de los aislamientos T037-3, T066, T051-2 y T069-1. MEA: (A: reverso, B: anverso y C: textura), CYA 30°C: (D: reverso, E: anverso y F: textura), G: conidióforo, H: hifas y I: esporas.
 Fuente: Autor.

La cepa T031-1 en MEA presentó las siguientes características: **Reverso:** colonia color beige a amarillo, diámetro de 40 mm y sin liberación de pigmentos; **Anverso:** colonias color café oliva oscuro, surcadas, sin producción de exudados, y textura polvosa (**Figura 14: A, B y C**); en medio CYA 30°C se presentaron las siguientes características: **Anverso:** colonias color amarillo pálido, diámetro de 45 mm, sin liberación de pigmentos; **Reverso:** colonias café oliva oscuras con generación de surcos, sin presencia de exudados, de textura polvosa (**Figura 14: D y E**); en medio CYA 37°C, **Reverso:** colonias color café a beige, con diámetro de 32 mm y sin liberación de pigmentos; **Anverso:** colonias color café con presencia de surcos, de textura polvosa y sin presencia de exudados. (**Figura 14: F y G**). Lo referente a su morfología microscópica se observó conidióforos de pared delgada, hialinos. Vesículas subsféricas. Cabezuelas radiadas, biseriadas. Conidias café, ornamentadas, esféricas e hifas hialinas septadas gruesas (**Figura 14: H, I y J**). Según la descripción macro y microscópica la cepa pertenece al género de *Aspergillus cf.* (Samson *et al.*, 2014), especie por confirmar molecularmente.

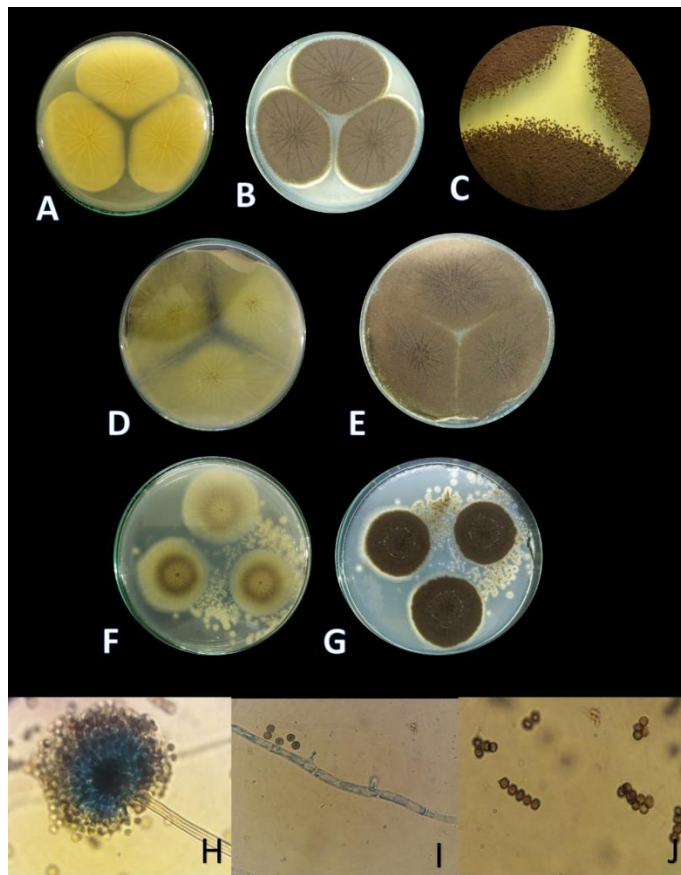


Figura 14: Caracterización macroscópica del aislamiento T031-1. MEA (A: reverso, B: anverso y C: textura); CYA 30°C: (D: reverso y E: anverso); CYA 37°C: (F: reverso y G: anverso); H: conidióforo, I: hifas y J: esporas.

Fuente: Autor:

La cepa T048, presentó las siguientes características macroscópicas en medio MEA: **Reverso:** colonia color amarillo, diámetro de 40 mm y sin liberación de pigmentos; **Anverso:** colonias color verde claro, surcadas, con producción de exudados céntricos color amarillo pálido y textura aterciopelada (**Figura 15: A, B y C**); en medio CYA 30°C se presentaron las siguientes características, **Reverso:** colonias color amarillas-naranja, diámetro de 7 mm, sin liberación de pigmentos; **Anverso:** colonias verde oliva con formación de surcos, sin presencia de exudados, de textura aterciopelada con elevación y generación de surcos (**Figura 15: D, E y F**); en medio CYA 37°C no se presentó crecimiento. En cuanto a la descripción microscópica se observó un conidióforo biverticilado, con hifas septadas hialinas gruesas y esporas elipsoidales sin ornamentos, de pared delgada y color verde (**Figura 15: G, H, y I**). Según la descripción mencionada anteriormente la cepa pertenece al género *Penicillium* cf. (Visagie *et al.*, 2014), especie por confirmar molecularmente.

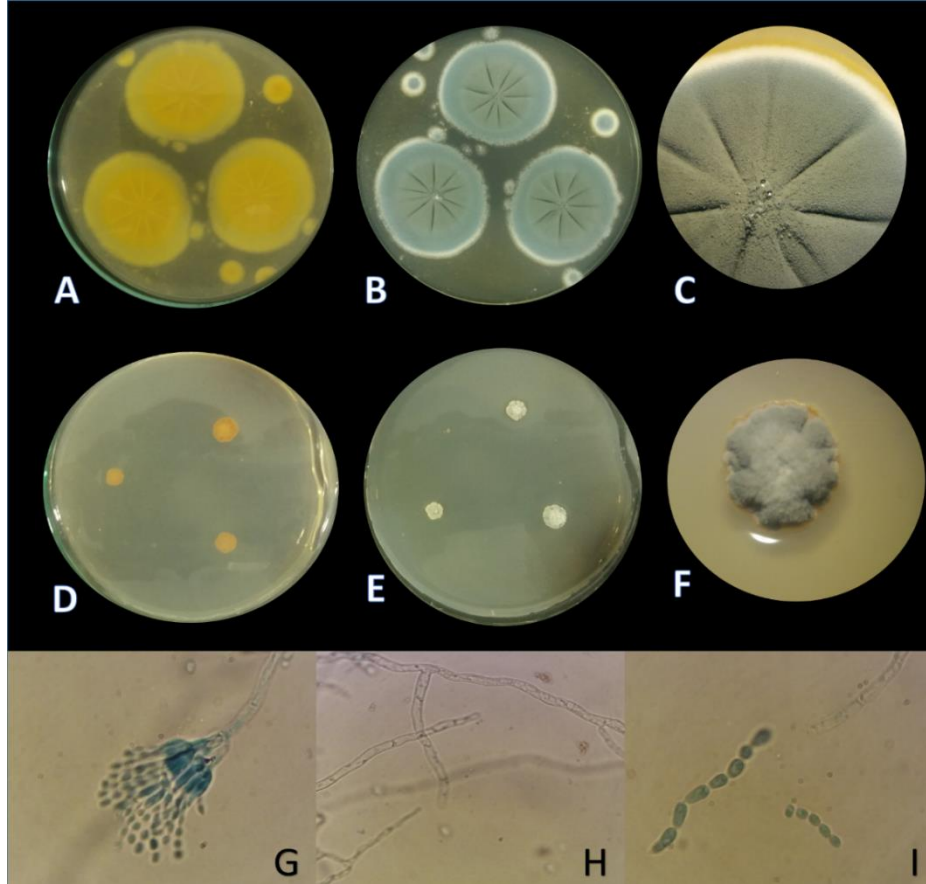


Figura 15: Caracterización macroscópica de aislamiento T048. MEA: (A: reverso, B: anverso y C: textura); CYA 30°C: (D: reverso, E: anverso y F: textura); G: conidióforo, H: hifas y I: esporas.

Fuente: Autor.

Las cepas T069-2 y T031-2, presentaron las siguientes características macroscópicas en medio MEA: **Reverso:** colonia color amarillo pálido, diámetro de 15 mm y sin liberación de pigmentos; **Anverso:** colonias color verde oliva oscuro, surcadas, sin producción de exudados y textura aterciopelada (**Figura 16: A, B y C**); en medio CYA 30°C se presentaron las siguientes características, **Reverso:** colonias color beige, diámetro de 24 mm, sin liberación de pigmentos; **Anverso:** colonias surcadas de color verde plateado oscuro, con formación de surcos, sin presencia de exudados, de textura aterciopelada (**Figura 16: D, E y F**); en medio CYA 37°C no se presentó crecimiento. En cuanto a la descripción microscópica se observó un conidióforo biverticilado, con hifas septadas oscuras, gruesas y esporas redondas sin ornamentos, de pared delgada y color verde (**Figura 16: G, H, y I**). Según la descripción mencionada anteriormente la cepa pertenece al género *Penicillium cf.* (Visagie *et al.*, 2014), especie por confirmar molecularmente.

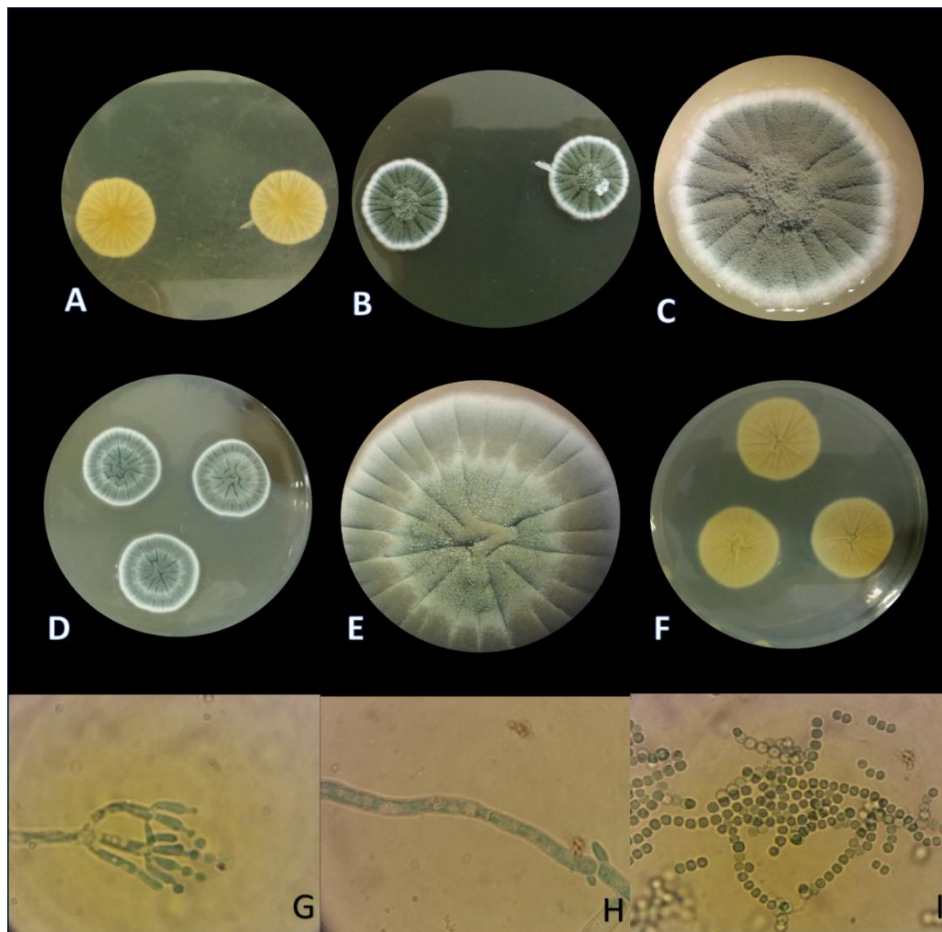


Figura 16: Caracterización macroscópica de los aislamientos T031-2 Y T069-2. MEA: (A: reverso, B: anverso y C: textura); CYA 30°C: (D: reverso, E: anverso y F: textura); G: conidióforo, H: hifas y I: esporas.
Fuente: Autor.

Las cepas T051 y T040, presentaron las siguientes características macroscópicas en medio MEA: **Reverso:** colonia color beige, diámetro de 23 mm y sin liberación de pigmentos; **Anverso:** colonias color verde oliva oscuro, surcadas, con producción de exudados sin coloración y textura aterciopelada (**Figura 17: A, B y C**); en medio CYA 30°C se presentaron las siguientes características, **Reverso:** colonias color verde-amarillo, diámetro de 36 mm, sin liberación de pigmentos; **Anverso:** colonias surcadas de color verde oliva, con formación de surcos, con presencia de exudados color rojo pálido, de textura aterciopelada (**Figura 17: D, E y F**); en medio CYA 37°C no se presentó crecimiento. En cuanto a la descripción microscópica se observó un conidióforo biverticilado, con hifas septadas delgadas y esporas redondas sin ornamentos, de pared delgada y color verde (**Figura 17: G, H, y I**). Según la descripción mencionada anteriormente la cepa pertenece al género *Penicillium* cf. (Visagie *et al.*, 2014), especie por confirmar molecularmente.

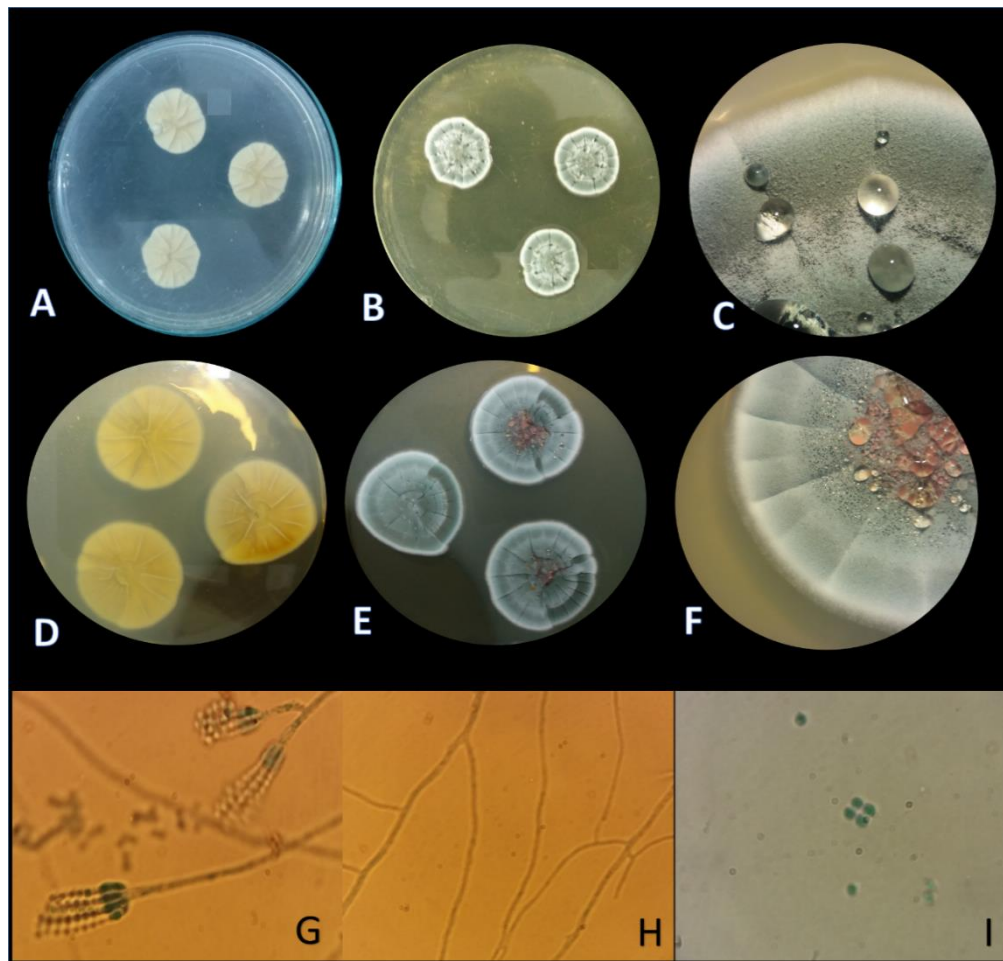


Figura 17: Caracterización macroscópica de los aislamientos T051 Y T040. MEA: (A: reverso, B: anverso y C: textura); CYA 30°C: (D: reverso, E: anverso y F: textura); G: conidióforo, H: hifas y I: esporas.

Fuente: Autor.

En estudios realizados por Alwindia y Guzman (2016) en café de Filipinas se muestra que *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *Penicillium verruculosum* fueron detectados en café Arabica en Benguet y Fugao, mientras que *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus japonicus* fueron aislados en Excelsa, Liberica y en Abra, Cavite y Davao. La contaminación por especies de *Aspergillus* y *Penicillium* se encontró en 59 y 19%, respectivamente, de las 57 muestras de cinco provincias. Después de la desinfección con hipoclorito de sodio al 1%, los niveles de infección por *Aspergillus* y *Penicillium* disminuyeron a 40 y 17%, respectivamente. Se identificaron un total de 1184 aislados fúngicos a nivel de especie que comprende secciones de *Aspergillus Circumdati* (cuatro especies), *Clavati* (uno), *Flavi* (uno), *Fumigati* (uno), *Nigri* (tres) y *Terrie* (uno). En la sección *Circundati*, el 70% de *A. ochraceus* produjo OTA en concentraciones de hasta 16238 ng/g, mientras que el 40% de *A. westerdijkiae* produjo una concentración

máxima de OTA de 36561 ng/g en agar sólido. Dentro de la sección *Nigri*, el 16,76% de *A. niger* produjo OTA con una concentración de 18439 ng/g, el 10% de *A. japonicus* a un nivel máximo de 174 ng/g y el 21,21% de *A. carbonarius* produjo OTA en concentración de 1900 ng/g. De las 12 especies de *Penicillium* aisladas, *P. verruculosum* era ocratoxigénico, con una producción máxima de OTA de 12 ng/g.

7.5. Ensayo preliminar para el biocontrol de hongos con potencial producción de OTA

Estos ensayos se realizaron en el fin de encontrar una posible solución al problema de contaminación por hongos Ocratoxigénicos y consecuentemente con la producción de OTA, los ensayos fueron realizados de manera *in vitro* sobre agar leche de coco, para evidenciar de manera cualitativa si existe o no producción de OTA.

Los resultados aquí obtenidos muestran que los biocontroladores utilizados (*Trichoderma harzianum* y *A. brasiliensis*), son candidatos que presentan un gran potencial para el biocontrol de hongos productores de OTA; *T. harzianum* mostró tener un mejor potencial para el biocontrol que *A. brasiliensis*, ya que este hongo tiene una tasa de desarrollo elevada la cual sobrepasa la de los hongos Ocratoxigénicos, lo que hace que *T. harzianum* cubra rápidamente la placa y por competencia no permite el desarrollo de los hongos seleccionados como Ocratoxigénicos; *A. brasiliensis* crece a la par de las cepas ocratoxigénicas, permitiendo así su desarrollo pero se observa cualitativamente que la producción de OTA se reduce considerablemente (**Figura 18**).

Los resultados mostrados concuerdan con los obtenidos por Vankudoth *et al.*, (2016) en donde se estudió la interacción entre cepas fúngicas autóctonas en la prevención de la producción de OTA por *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum*, la inhibición total de la producción de OTA se registró con *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ustus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum* y *Trichoderma viridae*.

Esta es una estrategia prometedora para reducir la contaminación por micotoxinas en alimentos y piensos, que consiste en involucrar la interacción biológica entre las cepas no toxigénicas y toxigénicas de la misma especie (Dorner *et al.*, 2003).

Mientras tanto, varios investigadores se han centrado en la desintoxicación de micotoxinas mediante reacciones de biotransformación que incluyen acetilación, hidrólisis, desaminación y descarboxilación (McCormick, 2013). Se informa que varios hongos, como *Phoma* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Alternaria* spp. y

Trichoderma spp., previenen la producción de aflatoxina B1 por *Aspergillus flavus* (Vankudoth *et al.*, 2016).

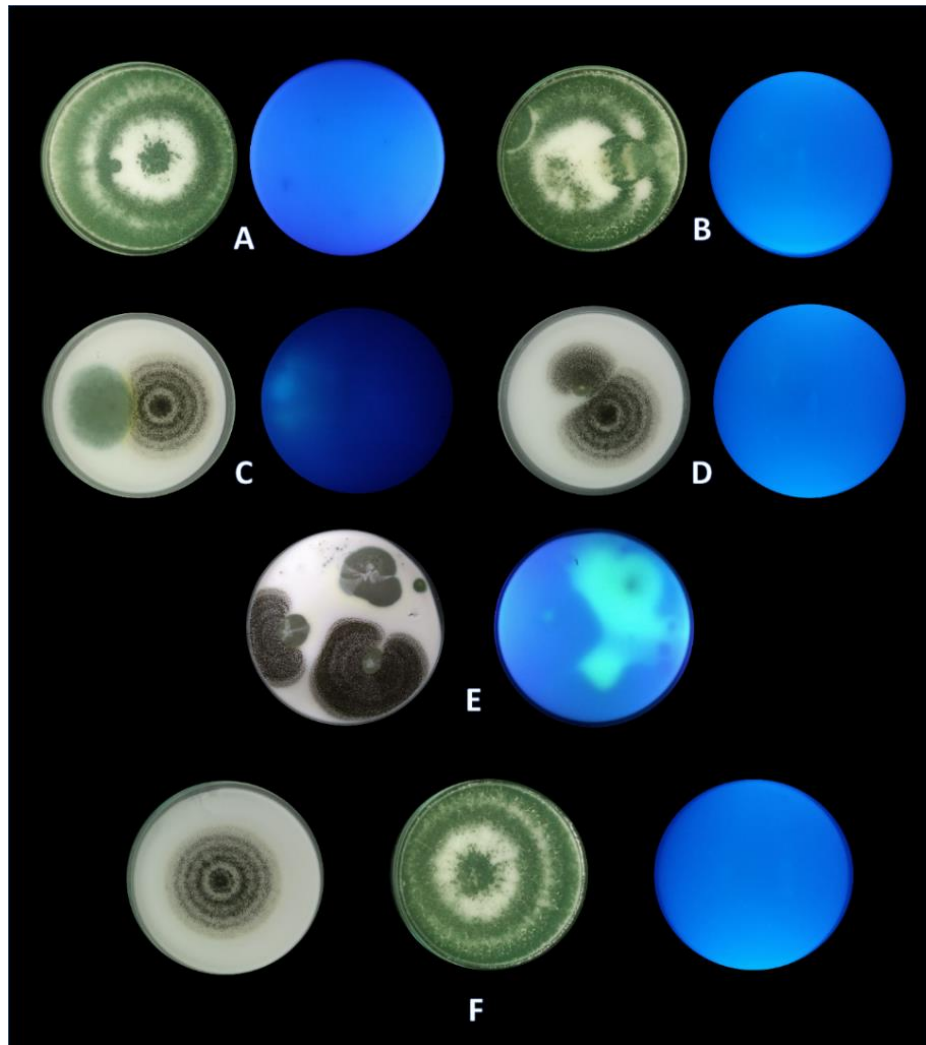


Figura 18: Ensayo preliminar para biocontrol de hongos con potencial en la producción de OTA. A y B: ensayo con *T. harzianum*, C, D y E: ensayo con *A. brasiliensis*, F: controles de *A. rasilensis* y *T. harzianum*.

Fuente: Autor

Utilizando a *Trichoderma harzianum* como biocontrolador los primeros 4 días de incubación de las placas se observó una fluorescencia muy débil que luego se desvaneció por completo, esto es debido a que este biocontrolador cuenta con la maquinaria enzimática capaz de degradar la OTA; esto debido a que posee oxidasas y lacasas (Sowmya, Ramalingappa, Krishnappa, y Thippeswamy, 2014).

Souza *et al.*, (2017) evaluaron el potencial antagonista de 32 aislados de levadura silvestre de la fermentación del café y el frijol de cacao. Estas levaduras se inocularon en cocultivo con *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus ochraceus*, como resultado se obtuvo que las levaduras presentaron mayores efectos inhibidores (53% en relación con el control) sobre el crecimiento micelial de *A. ochraceus* aislado, *Rhodotorula mucilaginosa* fue eficaz en la inhibición de la producción de OTA por los tres aislamientos de *Aspergillus*. *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia anomala* mostraron un alto potencial como agentes de control biológico en las condiciones probadas.

Shi *et al.*, (2013) estudiaron una cepa de *Bacillus* spp. (*B. subtilis* w14), aislado de excrementos de alce fresco podía inhibir el crecimiento de las especies *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus carbonarius* productoras de OTA, con tasas de inhibición de 33.0 y 33.3% respectivamente, también las células degradaban el 97,6% de OTA después de 24 h de incubación a 30°C, y no se producían productos de degradación.

Ponsone *et al.*, (2011) evaluaron la eficacia de dos cepas de *Kluyveromyces thermotolerans* en la prevención del crecimiento de hongos Ocratoxigénicos y la acumulación de (OTA) tanto "*in vitro*" como "*in situ*". Los datos de este estudio mostraron que ambas cepas de levadura fueron capaces de controlar el crecimiento de especies agregadas de *A. carbonarius* y *A. niger* y la acumulación de ocratoxina A. En todas las condiciones analizadas, la acumulación de OTA se redujo de 3% a 100% y la tasa de crecimiento de 11% a 82,5%, dependiendo de las condiciones.

Otras estrategias biotecnológicas para el control de hongos Ocratoxigénicos es la utilización de aceites esenciales (Tarazona *et al.*, 2017), las películas diseñadas aplicadas en fase de vapor, pueden ser potentes agentes antifúngicos contra *A. steynii* y *A. tubingensis* e inhibidores potentes de la biosíntesis de OTA.

Actualmente hay pocos estudios que buscan el biocontrol de cepas micotoxigénicas sobre las diferentes matrices alimentarias.

7.6. Optimización del protocolo para la extracción de ADN.

La optimización del protocolo de extracción de material genético a partir de hongos filamentosos, surge como una necesidad de presentar un protocolo de extracción de ADN que se adapte a las condiciones de procesamiento del grupo de investigación, ya que en el mismo no se cuenta con microperlas o un suministro de nitrógeno líquido, elementos utilizados para promover la lisis del micelio y permitir la salida del material genético, el cual será utilizado como molde para realización de PCR e identificación molecular.

El protocolo de extracción utilizado, mostró resultados satisfactorios en cuanto al aislamiento del ADN a partir de hongos filamentosos, utilizando la temperatura como agente físico que intensifica la lisis y garantiza la salida del ADN al exterior celular.

De las variantes del protocolo utilizado para la extracción de ADN que produjo los mejores resultados fueron los obtenidos mediante la metodología no modificada (carril 3), a comparación con los resultados obtenidos con la columna de purificación (carril 2) (**Figura 19**).

En el carril 3 se logra observar una banda tenue situada por encima de la banda más pesada del marcador de peso molecular 1 kb, indicando que se trata de ADN genómico; en el carril 2 no se presentó aislamiento de ADN, esto debido a que durante el procesamiento no se guardaron las relaciones que estipula el kit, en cuanto a buffer de unión y etanol absoluto, ya que durante el lisado se generaron aproximadamente 600 μ l, los cuales fueron utilizados en su totalidad, y deberían guardar una relación 1:1 con los demás reactivos, pero no fue posible ya que la columna presentaba un valor nominal de 800 μ l.

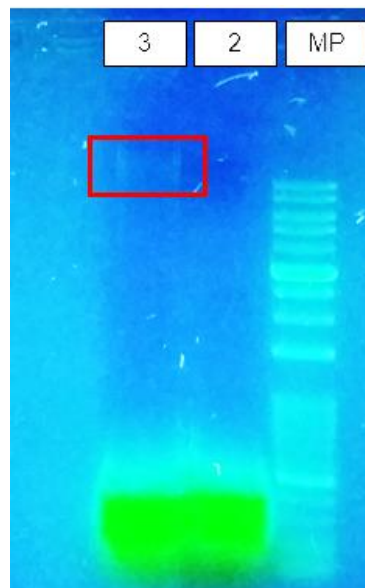


Figura 19. Corrida electroforética; MP: Marcado de peso molecular 1Kb; 2: protocolo modificado con columna de purificación y 3: protocolo no modificado.

Fuente: Autor.

Los resultados arrojados por el NanoDrop, muestran que el ADN aislado se encuentra a una concentración de 3773,3 ng/ μ l; en cuanto a la relación A_{260}/A_{280} se obtuvo un valor de 2.11; y por último en la relación A_{260}/A_{230} se obtuvo un valor de 1,45 (**Tabla 6**).

Lo anterior indica que el ADN aislado presenta una concentración adecuada para ensayos de PCR, y se encuentra libre de proteínas pero con una alta concentración de ARN según la relación A_{260}/A_{280} , a su vez el ADN analizado presenta según relación A_{260}/A_{230} contaminación por carbohidratos, estos resultados debido a la naturaleza de la matriz de extracción, la cual en su estructura presenta dichos compuestos en una elevada concentración (**Anexo 4**).

Según Del Valle, Rodríguez y Espinoza (2004), mencionan que una proporción de 0.6 para la relación (A_{260}/A_{280}) corresponde a la presencia única de proteínas; y una proporción entre 1.8–2.0, corresponde a un 90% - 100% de pureza de los ácidos nucleicos. Al respecto, Schultz, Craig y Cox. (1994); Del Valle *et al.*, (2004); De Jesús, Moreno y Martínez (2005) mencionan que los valores mayores a 2.0 de la relación indican exceso de ARN; para la relación (A_{260}/A_{230}) valores menores a 2.0 indican presencia de carbohidratos y fenoles, indicando también la integridad de los ácidos nucleicos (ARN), valores inferiores a 2.0 permiten suponer la presencia de degradación de las moléculas (Ruiz, *et al.*, 2010).

Un protocolo similar fue utilizado por Lura *et al.*, (2003), en donde analizaron varios protocolos de extracción, obteniendo una concentración media de 9,75 mg de ADN/g y una pureza de 1,876 A_{260}/A_{280} , al utilizar esta técnica se lograron obtener buenos resultados.

Tabla 6. Análisis espectrofotométrico por NanoDrop.

Muestra	Concentración	Unidades	260/280	230/280	Tipo de muestra
T051 -2	3773,3	ng/μl	2,11	1,45	ADN

El ADN aislado pertenece a la muestra T051-2, 260/280: contaminación por proteínas, 260/230: contaminación por carbohidratos y fenoles.

Fuente: Autor.

Este protocolo se adapta a las condiciones de procesamiento reales del grupo de investigación, ya que no se cuenta con un suministro de nitrógeno líquido o micro perlas, ambos usados para facilitar la lisis celular; las modificaciones realizadas a este protocolo suplen esta necesidad. También resulta ser reproducible, obteniendo un ADN con la calidad para realizar una PCR.

8. CONCLUSIONES

- La Ocratoxina A muestra una elevada incidencia en todas las etapas de beneficio del café producido en Toledo con un valor de 96,3% para el total de muestras, para cada etapa de beneficio se encontraron valores de incidencia del 93,3% para café cereza y pergamino, y un 100% para el café molido y tostado; de las 60 muestras de café analizadas, se encontró que un total de 31 muestras (51,6%) superaron el límite de 5 ppb,; en todas las etapas de beneficio del café se evidenciaron concentraciones superiores a esta, en la etapa de café cereza 6 muestras superaron este límite, para el café pergamino 8 muestras, en el café tostado 6 y en el café molido 11, valores representados en porcentajes con una equivalencia de 40%, 53,3%, 40% y 73,3%, respectivamente.
- Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que en todas las etapas de beneficio del café producido y comercializado en Toledo N-S. presentan contaminación por OTA en concentraciones medias que van desde 4,00 a 6,27 ppb, indicando que ninguna etapa de procesamiento elimina esta micotoxina, incluyendo la etapa de tostación, la cual logra reducir su concentración pero no elimina la OTA; sólo dos de las etapas (Pergamino y Molido) superaron el límite de 5 ppb establecido en la Resolución MPS 4506 del 2013, lo cual indica que este producto representa un riesgo para la salud del consumidor.
- El desarrollo de los hongos está condicionado por diferentes variables fisicoquímicas (pH, porcentaje de humedad y Aw), todas estas características se vieron fuertemente influenciadas por los tratamientos a los cuales se somete el grano de café para la obtención del producto final, según los resultados obtenidos de la variables analizadas, las etapas que brindan las condiciones adecuadas para el desarrollo de hongos micotoxigénicos son las etapas de café cereza y pergamino, identificando a la etapa de café pergamino como una etapa crítica, ya que es la más susceptible a la contaminación por OTA, ya que en esta no se realiza un control adecuado de las variables ambientales.
- De los medios utilizados para seleccionar cepas ocratoxigénicas, el que presentó mejores resultados fue el agar leche de coco; de un total de 57 aislamientos se lograron seleccionar 10 cepas como posibles productoras de OTA, se logró confirmar la presencia de esta toxina en niveles de 10 y 15 ppb

a su vez esta es una técnica muy útil ya que permite el ahorro de análisis, tiempo y dinero.

- La caracterización macro y microscópica de los hongos seleccionados como productores de OTA, ubicó a 9 cepas dentro del género *Penicillium* y una cepa se logró clasificar dentro del género *Aspergillus* géneros dentro de los cuales se encuentran especies con un alto potencial en la producción de OTA, las especies de ambos géneros están por determinarse mediante biología molecular.
- De las cepas utilizadas en el ensayo de biocontrol *in vitro* de hongos con potencial producción de OTA, *T. harzianum* resultó obtener los mejores resultados ya que esta cepa evita el crecimiento exagerado del hongo micotoxigénico, y de manera cualitativa se evidenció que es capaz de eliminar la OTA, indicando que esta cepa puede ser utilizada *in situ* para el biocontrol de especies toxigénicas.
- Se logró optimizar el protocolo de extracción de ADN a partir de hongos filamentosos obteniendo un ADN con una concentración de 3773,3 ng/μl, el cual se encuentra libre de proteínas, pero con una elevada concentración de ARN según la relación A_{260}/A_{280} , y según la relación A_{260}/A_{230} , muestra contaminación por carbohidratos, fenoles entre otros compuestos, a su vez estos valores indican que el ADN aislado puede ser utilizado como plantilla para ensayos de PCR. Este protocolo demostró ser sencillo, económico y reproducible, y se utilizará para obtener el ADN de todas las cepas seleccionadas como productoras de OTA, para así poder identificarlas a nivel molecular.
- Esta investigación representa una gran importancia, al ser el primer estudio de este tipo realizado en Colombia, puede servir como base para la realización de futuras investigaciones en esta área.

9. RECOMENDACIONES

Durante el desarrollo de esta investigación, se presentaron algunos inconvenientes de los cuales surgen las siguientes recomendaciones, las cuales pueden servir para aplicarse a futuras investigaciones en esta área.

- Se recomienda en futuras investigaciones donde se utilicen inmunoensayos, realizar una comparación de los resultados con otras técnicas analíticas como lo es HPLC, con la finalidad de ver si existen diferencias significativas entre las técnicas analíticas.
- Determinar el límite de detección de la OTA en el medio leche de coco, con fin de establecer desde qué concentración se logra visualizar la fluorescencia emitida por esta micotoxina.
- Realizar en materia de biocontrol un ensayo más profundo, con cepas confirmadas como positivas para la producción de OTA como *A. ochraceus* o *Penicillium verrucosum*, cepas que son reconocidas por súper-producir esta toxina, para evaluar el verdadero papel de los biocontroladores sobre el desarrollo de estos hongos y la producción de OTA.
- Evaluar de manera *in vitro* sobre la matriz alimentaria, asimilando las condiciones ambientales propias de cada proceso con el fin de evaluar la aplicabilidad de estos biocontroladores sobre el control de hongos Ocratoxigénicos de manera *in situ*.
- Identificar molecularmente los hongos seleccionados como productores de OTA, para tener un 100% de certeza en cuanto a la identificación a nivel de especies, y saber si se tratan de hongos citados como productores de OTA, o si son nuevas especies productoras de esta toxina.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G.; Cabañes, F.J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl Environ Microbiol*; 60: 2650-2.
- Alvindia, D. and De Guzmán, M. (2016). Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. *Mycotoxin Research*, 32(2), pp.61-67.
- Araguas, C.; González, E.; López de Cerain, A.; Bello, J. (2003). Acerca de la posible contaminación por Ocratoxina A en alimentos I: Cereales cultivados en diversas zonas geográficas de la comunidad foral de Navarra. *Alimentaria*; 343: 23-9.
- Archila, M. (1985). Análisis bacteriológico de aguas residuales de beneficio de café. Bogotá: Universidad de Los Andes. Facultad de Microbiología. 40 p. Tesis: Microbióloga.
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., & Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*, 20, 784–790.
- Beer, J.; Muschler, R.; Kass D. y Somarriba, E. (1998). Shade management in coffee and cacao plantations. *Agroforestry Systems*, 38: 139–164.
- Benites, A., Fernandes, M., Boleto, A., Azevedo, S., Silva, S., & Leitão, A. (2017). Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control*, 73, 1223-1228.
- Blanc M, Pittet A, Muñoz-Box R, Viani R. (1998). Behaviour of Ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. *J Agric Food Chem*; 46: 673-5.
- Blanc, M., Vuataz, G., & Hilckmann, L. (2001). Green coffee transport trials. 19th Proc. ASIC Coffee Confer., Trieste, Italy, 14–18 May.
- Blanco R, Pavón MA, González I, García T, Martín MR. (2007). Detección de Ocratoxina A en higos secos utilizando el anticuerpo MAP1 y una técnica de ELISA competitivo. *Rev Complut Cienc Vet*; 1 (2): 246-252.

- Bucheli P, Meyer I, Pittet A, Vuataz G, Viani R. 1998. Industrial storage of Robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. *J Agric Food Chem.* 46:4507–4511.
- Bucheli, P., Kanchanomai, C., Meyer, I. & Pittet, A. (2000). Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canefora*) coffee cherry drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1358–1362.
- Cantafora, A., Grossi, M., Miraglia, M., and Benelli, L., (1983). Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed phase high performance liquid chromatography. *La Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione*, 12, 103-108.
- Carrillo, L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta, Salta.
- Cormick, S. (2013). Microbial Detoxification of Mycotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), pp.907-918.
- Chen, A. J., Tang, D., Zhou, Y. Q., Sun, B. D., Li, X. J., Wang, L. Z. and Gao, W. W. (2013). Identification of Ochratoxin A Producing Fungi Associated with Fresh and Dry Liquorice. *Public Library of Science* 8: 1-13.
- Coronel, M., Marin, S., Cano, G., Ramos, A., & Sanchis, V. (2011). Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: Occurrence and assessment of the exposure in Catalonia. *Food Control*, 22(3-4), 414-419.
- De Jesús, R.; N. Moreno y J. A. Martínez. (2005). Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Revista Científica* 15 (2): 134-140.
- Del Valle, C.; A. Rodríguez y M. Espinoza. (2004). Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Complejo de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, Heredia, Costa Rica. Rev. Biol. Trop.* 52 (3): 717-725.
- Dorner, J.; Cole, R.; Connick, W.; Daigle, D.; McGuire, M. and Shasha, B. (2003). Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts. *Biological Control*, 26(3), pp.318-324.
- Duarte, S.C.; Peña, A.; Lino, C.M. (2009). A review on Ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiol*; 2 (27): 187-198.
- Fairtrade Foundation. Fairtrade and coffee. {28 de marzo del 2018} disponible en:

http://www.fairtrade.org.uk/includes/documents/cm_docs/2012/F/FT_Coffee_Report_May2012.pdf

FAO, Enfoques: Ocratoxina A (OTA) en el café. (2006), {28 de marzo del 2018} disponible en: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0607sp1.htm>

FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS, La gente del café, (2010). {28 de marzo del 2018} disponible en: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/la_tierra_del_cafe/la_gente_del_cafe/

FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS. El café de Colombia, 2010. {28 de marzo del 2018} disponible en: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/el_cafe_de_colombia/

Food-Info.net: La planta de café. (2018). Food-info.net. {2 de abril del 2018} disponible en: <http://www.food-info.net/es/products/coffee/plant.htm>

Frenette, C., Paugh, R., Tozlovanu, M., Juzio, M., Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. (2008). Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites. *Analytica Chimica Acta*, 617(1-2), 153-161. doi: 10.1016/j.aca.2007.12.030

Frisvad, C. J., Frank, M. J., Houbraken, A.M.P. J., Kuijpers, F.A. A. and Samson, A. R. (2004). New ochratoxin a producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in mycology* 50: 23–43.

Frisvad, J.C.; Samson, R.A. (1991). Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. In: Arora D.K; Mukerji K.G.; Marth, E.H. Eds. *Handbook of applied mycology. V.3. Foods and feeds*. New York, Marcel Dekker. p. 31- 68.

Gaitán, A. (2012). Presence of *Aspergillus* and other fungal symbionts in coffee beans from Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 17(1), 39-50.

Gallo, A.; Bruno, K.; Solfrizzo, M.; Perrone, G.; Mulé, G.; Visconti, A. & Baker, S. (2012). New Insight into the Ochratoxin A Biosynthetic Pathway through Deletion of a Nonribosomal Peptide Synthetase Gene in *Aspergillus carbonarius*. *Applied And Environmental Microbiology*, 78(23), 8208-8218.

Gimeno, A. (2002), *Los Hongos y las Micotoxinas en la Alimentación Animal; Conceptos, Problemas, Control y Recomendaciones*, Engormix – Micotoxinas.

Harris JP, Mantle PG. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* 55:709–716.

- Heenan, C.N.; Shaw, K.J.; Pitt, J.I. (1998) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol.* 1, 67–72.
- Huff WE, Hamilton PB. (1979). Mycotoxins their biosynthesis in fungi: ochratoxins metabolites of combined pathways. *J. Food Prot.* 42:815–820.
- Jaramillo, E. (2011). Prevalencia de aflatoxinas en la producción de café tostado. Proyecto final de graduación presentado como requisito parcial para optar por el título de Master en administración de programas sanitarios con énfasis en inocuidad de alimentos, Universidad para la Cooperación Internacional, Costa Rica.
- Joosten HMLJ, Goetz J, Pittet A, Schellenberg M, Bucheli P. (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *Int J Food Microbiol.* 65:39–44.
- Kononenko, G., Burkin, A., Zotova, E. and Soboleva, N. (2000). Ochratoxin A: Contamination of grain. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(2), pp.177-180.
- Krug, C., Mendes, J., & Carvalho, A. (1949). Taxonomía de *Coffea arabica* L.: II - *Coffea arabica* L. Var. Caturra e sua forma Xanthocarpa. *Bragantia*, 9(9-12), 157-163.
- Kuiper-Goodman T. (1996). Risk assessment of Ochratoxin A: an update. *Food Addit Contam.* 13 (Suppl.): 53-7.
- Kuntawee, S., & Akarapisan, A., (2015). Isolation and identification of *Aspergillus* species producing Ochratoxin A in Arabica coffee beans. *Journal of Agricultural Technology*, 11, 1235 – 1242.
- Liang, L, Z., Li, J., Hao, J., Xu, Y., Huang, K., Tian, J., He, X. and Xu, W. (2013). Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), pp.1879-1885.
- Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A. D. and Scott, E. S. (2007). Ochratoxin A- producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology* 45: 301–306.
- Levi C, Trenk HL, Mohr HK. (2007). Study of the occurrence of Ochratoxin A in green coffee beans. *J Assoc Off Anal Chem* 1974; 57: 866- 70. En: Soriano del Castillo J. *Micotoxinas en Alimentos*. Madrid: Ediciones Díaz Santos. 201-22.
- Levi, C. P. (1980). Mycotoxins in coffee. *Journal of the Association of the Official*

Analytical Chemists, 63(6), 1282-1285.

- López de Cerain A, Soriano JM. (2007). Ochratoxina A. En: Soriano del Castillo J., editor. Micotoxinas en Alimentos. Madrid: Ediciones Díaz Santos. 201-22.
- López de Ceraín, A., A. M. Jiménez, O. Ezpeleta, O. Bello, (2000). Efectos tóxicos de la Ochratoxina. Revista de Toxicología 17: 61-69.
- Lura, Benites, Jáuregui y Gonzales. (2003). Evaluación de diferentes técnicas de extracción del ADN de hongos filamentosos; revista FABICIB; Vol 7, p: 37-44.
- Magan, N. and Aldred, D. (2005). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. Food Additives & Contaminants, 22(1), pp.10-16.
- Mantle, G. P. and Chow, M. A. (2000). Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. International Journal of Food Microbiology 56: 105–109.
- Marín S, Bellí N, Ramos AJ, Sanchis V. (2005). Presencia de Ochratoxina A en vinos y derivados de uva. Alim Nutr Salud; 3 (12): 113-8.
- Martínez MR., & Anadón A. (2006). Micotoxinas. En: Cameán AM, Repetto M, editores. Toxicología alimentaria. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 289-07.
- Masefield, G. B.; Wallis, M.; Harrison, S.G.; y Nicholson, B.E. (1980). Guía de las plantas comestibles. Ediciones Omega. 110.
- Micco, C., Grossi, M., Miraglia, M., & Brera, C. (1989). A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. Food Additives and Contaminants, 6, 333–339. Microbiology 36: 177– 180.
- MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Decreto 3075 de 1997. Bogotá: Ministerio de Salud, 1997. 32 p
- Monaci L, Palmisano F. (2004) Determination of Ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. Anal Bioanal Chem; 378: 96-103.
- Moreas MH, Luchese RH. (2003). Ochratoxin A on green coffee: Influence of harvest and dry processing procedures. J Agric Food Chem. 51(19):5824–5828.
- Munsell Color Company (2000). Munsell Soil Color Charts. Munsell Color GretagMacbeth, New Windsor, New York.

- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., & Ueno, Y. (1997). Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural*
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*. 128(2): p. 197-202.
- Oliveros, E., Ramírez, A., Sanz, J., Peñuela, E. (2006). Secador solar de túnel para cafépergamino. Chinchiná: CENICAFÉ, 8p. (Avances Técnicos No. 353)
- Palacios-Cabrera, H. A., Menezes, H. C., Iamanaka, B. T., Canepa, F., Teixeira, A. A., Carvalhaes, N., et al. (2007). Effect of temperature and relative humidity during transportation on green coffee bean moisture content and ochratoxin A production. *Journal of Food Protection*, 70, 164–171.
- Palacios-Cabrera, H., Taniwaki, M., Menezes, H. and Iamanaka, B. (2004). The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. *Food Control*, 15(7), pp.531-535.
- Pardo, E., Ramos, J., Sanchez, V., Marin, S. (2005). Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. *International journal of food microbiology* 98:1-9.
- Paterson, R. R.M., & Lima, N. (2011). Furthermycotoxin effects from climate change. *Food Research International*, 44, 2555–2566.
- Peñuela, M., Pabón, J., Rodríguez, N., Oliveros, E. (2010). Evaluación de una enzima pectinolítica para el desmucilaginado del café. *Cenicafé* 61(3):241-250.
- Peraica, M., B. Radic, A. Lucic, M. Pavlovic, (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 77: 754-766.
- Pitt, J. & Hocking, A. (2009). *Fungi and food spoilage*. New York: Springer-Verlag.
- Pittet, A.; Tornare, D.; Huggett, A.; Viani, R. (1996). Liquid chromatographic determination of Ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinty column cleanup procedure. *J Agric Food Chem*; 44 (11): 3564-9.
- Ponsone, M., Chiotta, M., Combina, M., Dalcerro, A. and Chulze, S. (2011).

Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), pp.70-77.

- Puerta, G. (2011). Composición química de una taza de café. *Cenicafé* 414; 1-12.
- Puerta, I. (2006). Quality and safety of coffee processed by the wet method and dried in solar dryers. Salvador [Brasil]: Workshop improvement of coffee quality through prevention of mould growth, 2006. 1 p.
- Quinta, L.M. (1982). Publicações do Laboratorio Nacional de Engenharia e Tecnología Industrial.- LNETI-DCEAI nº 92, ET-10, pp.1-12.
- Ramírez, F., Silva, G.; Valenzuela, C.; Villegas, C.; Villegas, A. (2002). Resumen Ejecutivo. Comisión de Ajuste de la Institucionalidad Cafetera, C.d.A.d.I.I. Cafetera.
- Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A., & Hardison, A. (2006) La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215-1226.
- Rev. Toxicol., 17, pp. 61-69
- Riddell, R. (1950). Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. *Mycologia*, 42(2), 265.
- Roa, G., Oliveros, E. (1999). Beneficio ecológico del café. Chinchiná: CENICAFÉ, 300 p.
- Rodríguez, N. (1993). Utilización de la pulpa de café para el cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus*: Informe anual de actividades 1992-1993. Chinchiná: CENICAFÉ. 15 p.
- Romani, S., Sacchetti, G., López, C.C., Pinnavia, G.G. & Rosa, M.D. (2000). Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3616–3619.
- Ruíz, S.B.; Rojas, M.R.I.; Ruíz, H.H.; Mendoza, N.P.; Oliva, L.M.A.; Ibarra, M.C.E.; Aguilar, T.G.; Herrera, H.J.G.; Hernández, G.A.; Sanzón, G.D.; Bautista, T.G.U.; Ruíz, M.J.; Medina, S, L.M. (2010). Extraction and quantification of DNA bovine of straws semen criopreserved; *Revista Científica UDO Agrícola*, Vol.10 No.1 pp.103-108.
- Samson, R., Visagie, C., Houbraken, J., Hong, S., Hubka, V., & Klaassen, C. *et al.*, (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*.

Studies In Mycology, 78, 141-173. Doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004

- Sanz, U., Oliveros, T., Ramírez, G., Peñuela, M., Ramos, G. (2013). Proceso de beneficio. In: Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura. Chinchiná: FNC: CENICAFÉ. 3 vols.
- Schultz, D.J.; R. Craig, D.L. Cox Foster, R.O. Mumma and J. I. Medford. (1994). RNA isolation from recalcitrant plant tissue. Plant Mol. Biol. Rep. 12: 310-316.
- Schwartz, G.G. (2002). Hypothesis: Does Ochratoxin A cause testicular cancer?, Cancer Causes Control; 13: 91-100.
- Scott, P.M. (2005). Biomarkers of human exposure to Ochratoxin A. Food Addit Contam; 22 (1): 99-107.
- Serra, R.; Abrunhosa, L.; Kozahiewicz, Z.; Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as Ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. Int J Food Microbiol; 88: 63-8.
- Sowmya, H., Ramalingappa, Krishnappa, M. and Thippeswamy, B. (2014). Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses. Environmental Monitoring and Assessment, 186(10), pp.6577-6586.
- Souza, Mariana Lino de, Passamani, Fabiana Reinis Franca, Ávila, Carla Luiza da Silva, Batista, Luís Roberto, Schwan, Rosane Freitas, & Silva, Cristina Ferreira. (2017). Use of wild yeasts as a biocontrol agent against toxigenic fungi and OTA production. Acta Scientiarum. Agronomy, 39(3), 349-358.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D., Schlatter, J., & Schlatter, C. (1995). The occurrence of ochratoxin A in coffee. Food And Chemical Toxicology, 33(5), 341-355.
- Suárez, L., Gonzales, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr, S., Guiraud, P. (2004) Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. Food microbiology 21:629- 634.
- Suárez-Quiroz M, Gonzalez-Rios O, Barel M, Guyot B, Schorr-Galindo S, Guiraud J-P. (2005). Effect of the post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee. Int J Food Microbiol. 103:339–345.
- Suárez-Quiroz, M., Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., & Guiraud, J. (2004). Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. International Journal Of Food Science And Technology, 39(5), 501-507.

- Taniwaki, M. H., Teixeira, A. A., Teixeira, A.R. R., Copetti, M. V., & Lamanaka, B. T. (2014). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. *Food Research International*,
- Taniwaki, M., Pitt, J., Teixeira, A. and Lamanaka, B. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), pp.173-179.
- Taniwaki, M., Pitt, J., Teixeira, A., & Lamanaka, B. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal Of Food Microbiology*, 82(2), 173-179.
- Tarazona, A., Gómez, J., Gavara, R., Mateo-Castro, R., Gimeno-Adelantado, J., Jiménez, M. and Mateo, E. (2018). Risk management of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in maize grains by bioactive EVOH films containing individual components of some essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 269, pp.107-119.
- Tozlovanu, M., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2010). Ochratoxin A in Roasted Coffee from French Supermarkets and Transfer in Coffee Beverages: Comparison of Analysis Methods. *Toxins*, 2(8), 1928-1942.
- Trigos, A. (2010). Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado; *Revista mexicana de micología* 32: 63-68
- Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Hisada, K., and Sakabe, Y., (1984), A survey of occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in imported green coffee beans. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, 19, 14-21.
- Urbano, G.R., Taniwaki, M.H., Leitao, M.F.D.F. & Vicentini, M.C. (2001). Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, 68, 1226–1230.
- Urbano, R., Taniwaki, H., (2000) Productions of ochratoxin A in green coffee: Influence of water activity and temperature. Guaruja [Brasil]: International iupac symposium on mycotoxins and phycotoxins. 200 p.
- Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Nature*; 205: 1112-3.
- Vankudoth, K., Boda, A., Sivadevuni, G. and Solipuram, M. (2016). Effect of indigenous fungi on ochratoxin A produced by two species of *Penicillium*. *Animal Nutrition*, 2(3), pp.225-228.

- Vatinno, R., Aresta, A., Zambonin, C. and Palmisano, F. (2008). Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1187(1-2), pp.145-150.
- Visagie, C., Houbraeken, J., Frisvad, J., Hong, S., Klaassen, C., & Perrone, G. *et al.* (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies In Mycology*, 78, 343-371. doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.001
- Visagie, C., Varga, J., Houbraeken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., & Yilmaz, N. *et al.* (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies In Mycology*, 78, 1-61. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.001
- Waller, J. M.; Bigger, M. y Hillocks, R. J. (2007). *Coffee Pests, Diseases and Their Management*. CABE. 437 pp.
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J., & Xing, F. *et al.* (2016). Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins*, 8(3), 83.
- William O, Berndt A, Wallace H, Phillips RD. (1980). Effects of mycotoxins on renal functions: Mycotoxic nephropathy. *Kidney Intern*; 18: 656-64.
- Zhang, X., Li, Y., Wang, H., Gu, X., Zheng, X., Wang, Y. *et al.* (2016). Screening and Identification of Novel Ochratoxin A-Producing Fungi from Grapes. *Toxins*, 8(11), 333.

11. ANEXOS

Anexo 1. Valores promedio de variables fisicoquímicas (pH, porcentaje de humedad y actividad de agua) y determinación de la concentración de OTA en las diferentes etapas del beneficio del café.

ETAPA	CODIGO	pH	% DE HUMEDAD	Aw	[OTA]
CEREZA	C001	4,86	72,61	0,97	4
	C002	4,98	70,31	0,99	4
	C003	4,06	71,52	0,98	5
	C004	6,11	75,88	0,94	3
	C005	5,28	59,37	0,90	1
	C006	4,33	66,52	0,97	1
	C007	4,10	66,74	0,98	4
	C008	4,35	73,79	0,98	0
	C009	4,67	69,45	0,94	1
	C010	4,82	67,40	0,97	7
	C011	5,49	52,24	0,96	13
	C012	5,42	67,33	0,99	5
	C013	5,87	72,30	0,96	11
	C014	5,60	70,78	0,98	4
	C015	4,99	69,31	0,98	6
PERGAMINO	P001	5,27	16,63	0,66	6
	P002	6,04	14,98	0,81	6
	P003	5,36	21,71	0,72	2
	P004	5,28	19,23	0,69	0
	P005	5,55	16,54	0,52	7
	P006	5,98	23,20	0,70	3
	P007	5,24	18,29	0,74	5
	P008	5,02	21,29	0,72	9
	P009	5,18	20,91	0,76	3
	P010	5,65	18,21	0,80	1
	P011	5,28	15,04	0,80	1
	P012	5,80	18,30	0,72	6
	P013	5,76	14,00	0,69	4
	P014	5,55	20,74	0,67	9

	P015	6,35	16,02	0,66	21
TOSTADO	T001	5,36	3,54	0,42	6
	T002	5,32	5,31	0,42	2
	T003	5,59	5,78	0,42	4
	T004	5,63	5,59	0,42	5
	T005	5,51	4,72	0,43	6
	T006	5,57	4,01	0,48	6
	T007	5,58	4,77	0,47	5
	T008	5,59	4,27	0,46	3
	T009	5,32	4,27	0,46	2
	T010	5,75	4,76	0,46	5
	T011	5,61	3,90	0,58	4
	T012	5,58	4,03	0,56	4
	T013	5,73	4,95	0,56	1
	T014	5,60	5,17	0,56	4
	T015	5,68	5,13	0,57	3
MOLIDO	M001	5,60	3,75	0,52	5
	M002	5,70	4,09	0,47	4
	M003	5,62	3,79	0,44	6
	M004	5,64	3,60	0,53	7
	M005	5,73	3,68	0,44	8
	M006	5,63	17,52	0,47	6
	M007	5,64	4,60	0,48	4
	M008	5,64	3,89	0,41	8
	M009	5,62	4,02	0,41	5
	M010	5,65	4,07	0,42	13
	M011	5,70	4,43	0,40	4
	M012	5,71	4,05	0,41	3
	M013	5,74	3,35	0,21	6
	M014	5,98	3,52	0,31	9
	M015	5,08	2,27	0,23	6

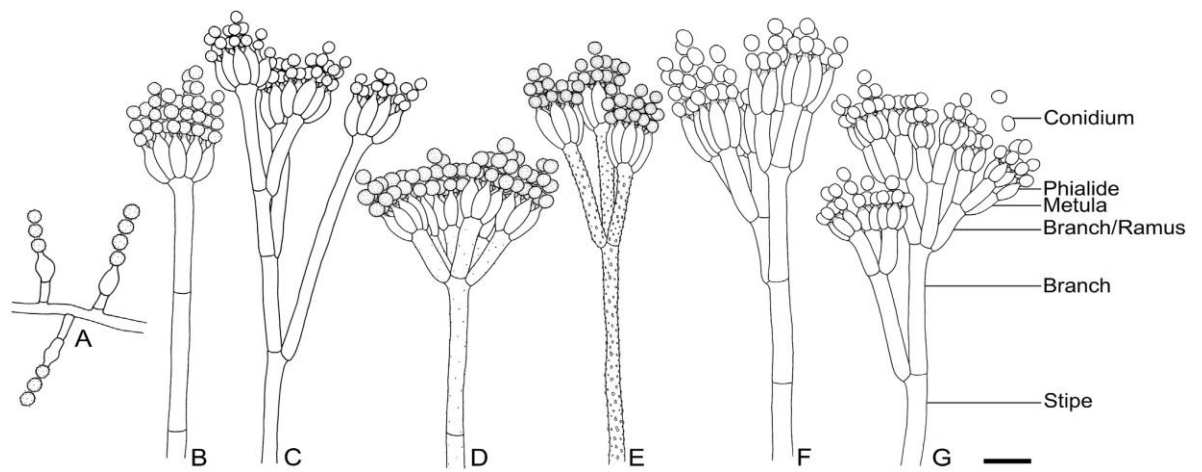
Un total de 60 muestras fueron analizadas (15 por cada etapa de beneficio), cada análisis fue realizado por triplicado, a excepción de la determinación de la concentración de la OTA.
Fuente: Autor.

Anexo 2. Composición de los medios usados para la caracterización macro y microscópica.

Solución Czapek concentrada	
NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
Agua destilada	100 ml
Solución elementos traza	
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
Agua destilada	100 ml
CYA - Pitt 1979	
s/n Czapek concentrada	10 ml
sacarosa	30 g
Extracto de levadura	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Solución de elementos traza	1mlm
Agar bacteriológico	20 g
Agua destilada	1000 ml
MEA - Samson <i>et al.</i> 2010	
Extracto de malta - agar	50 g
Solución metales traza	1 g
Agua destilada	1000 ml

Fuente : Visagie *et al.*, 2014.

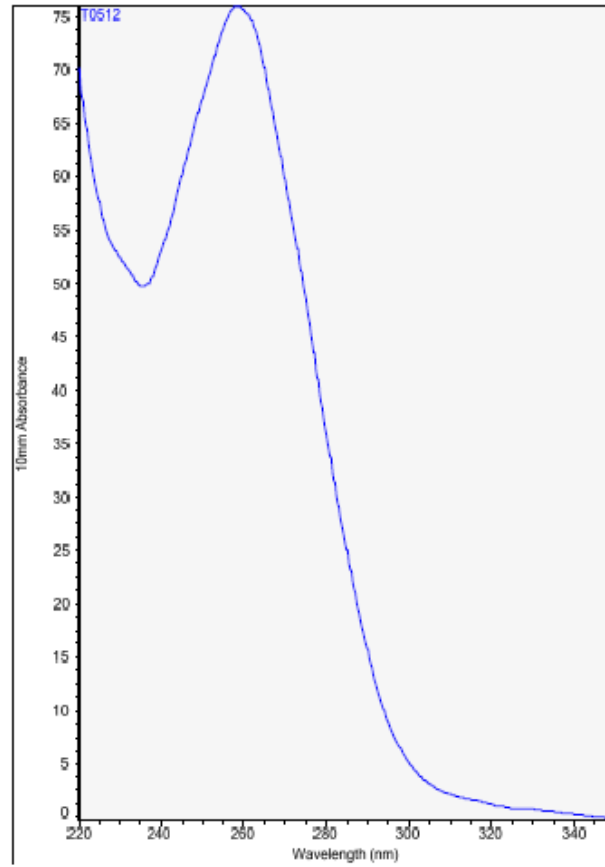
Anexo 3. Patrones de ramificación conidióforos observados en *Penicillium*.



A: conidióforo con una sola fialide; B: Monoverticilado; C: Diverticilado; D y E: Biverticilado; F: Terverticilado y G: Cuaterverticilado; Bar: 10 μ m.

Fuente: Visagie et al., 2014.

Anexo 4. *Gráfico de absorbancia espectrofotométrica – NanoDrop. :*



Anexo 5: ANOVA para cada una de las propiedades fisicoquímicas analizadas.

Tabla ANOVA para pH por Etapa de Beneficio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4,0244	3	1,34147	9,09	0,0001
Intra grupos	8,26194	56	0,147535		
Total (Corr.)	12,2863	59			

La tabla ANOVA descompone la varianza de pH en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 9,09255, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de pH entre un nivel de Etapa de Beneficio y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla ANOVA para porcentaje de Humedad por Etapa de Beneficio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	41191,5	3	13730,5	978,91	0,0000
Intra grupos	785,473	56	14,0263		
Total (Corr.)	41977,0	59			

La tabla ANOVA descompone la varianza de porcentaje de Humedad en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 978,911, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % de Humedad entre un nivel de Etapa de Beneficio y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla ANOVA para Aw por Etapa de Beneficio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2,82047	3	0,940155	203,12	0,0000
Intra grupos	0,259206	56	0,00462868		
Total (Corr.)	3,07967	59			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Aw en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 203,115, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Aw entre un nivel de Etapa de Beneficio y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Anexo 6: principio de la prueba ROSA.

