

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS  
EVALUACION DE *SACCHAROMYCES BOULARDII* EN LA REDUCCION DE  
COLONIAS DE *PENICILLIUM* Y *ASPERGILLUS* EN GRANOS DE CAFE ORO  
Y PERGAMINO.

PRESENTADO POR:  
ERIKA YESSENIA MALDONADO LOPEZ  
KARLA ILEANA ROMERO DE GRANDE

PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAESTRA EN MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

OCTUBRE DE 2022

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**RECTOR**

MAESTRO. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**SECRETARIO GENERAL**

MSC. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. REINA MARIBEL GALDÁMEZ

**SECRETARIA**

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

## HOJA DE APROBACIÓN DE PROYECTO DE TESIS

Evaluación de *Saccharomyces boulardii* en la reducción de colonias de *Penicillium* y *Aspergillus* en granos de café oro y pergamino.

### COMITÉ DE TESIS

MSc. Andrés Wilfredo Rivas.

---

#### Docente Asesor

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

---

#### Tribunal Evaluador

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz.

---

#### Tribunal Evaluador

MSc. Mario Herbert Romero Rivera

---

#### Coordinador de Maestría

MSc. Edith Alicia Torres de Cantón

---

#### Coordinadora de Posgrado

---

#### Estudiantes

Licda. Erika Yessenia Maldonado López.

Licda. Karla Ileana Romero de Grande.

Fecha de entrega: 21 de octubre de 2022.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Comité de Trabajo de Graduación: Coordinadora de Post grado, MSc. Edith Alicia Torres de Cantón; Tribunal Evaluador, MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez y MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz, MSc. Mario Herbert Romero, así como, a nuestro docente asesor, MSc. Andrés Wilfredo Rivas, por enriquecer el presente trabajo, a través del apoyo recibido y el aporte de sus conocimientos científicos a lo largo del mismo.

A todos nuestros docentes, por darnos importantes herramientas mediante los conocimientos impartidos durante la maestría.

Al personal del Laboratorio de microbiología de la empresa AgroBiotek, por su completa colaboración en la parte experimental del presente estudio.

Al personal del Beneficio Tuxpal, por abrirnos las puertas de su empresa para realizar las tomas de muestras y por facilitarnos de sus instalaciones para realizar esta investigación.

A nuestras familias, amigos y compañeros, por apoyarnos en todo este proceso.

A Dios por habernos guiado en este proyecto y permitirnos culminar nuestros estudios de maestría.

Erika y Karla.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
ABREVIATURAS	
RESUMEN	
CAPÍTULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	23
CAPÍTULO II	
2.0 OBJETIVOS	26
2.1. OBJETIVO GENERAL	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPÍTULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	28
3.1 Fruto del café	28
3.2 Beneficiado del café	28
3.3 Fase húmeda	29
3.4 Secado del café	30
3.5 Trilla del café pergamino	31
3.6 Almacenamiento del café	32
3.6.1 Estado sanitario del café	33
3.7 Micotoxinas	33
3.7.1 Condiciones de contaminación	34
3.7.2 Principales micotoxinas	35
3.7.3 Clasificación y toxicidad	36
3.7.4 Vías de transmisión alimentaria	37

3.7.5	Métodos para la cuantificación de ocratoxinas	38
3.8	Riesgo y recomendaciones para prevenir la ocratoxina A en café	38
3.8.1	Campo y beneficiado	38
3.8.2	Secado del café	38
3.8.3	Almacenamiento	39
3.9	Calidad sanitaria del grano de café y reglamentaciones	39
3.10	Métodos de protección contra la contaminación en alimentos	41
3.10.1	Levadura probiótica	41
3.10.2	Criterios para la selección de cepas de uso probiótico	42
3.11	Mecanismos de acción de las levaduras probióticas	42
3.11.1	Efecto antagónico de las enterobacterias y otras levaduras	42
3.12	Mecanismos específicos de las levaduras que difieren de las bacterias probióticas	43
3.13	Estudios en la aplicación de levadura probiótica	44
 CAPÍTULO IV		
4.0	METODOLOGÍA	46
4.1	Metodología del estudio	46
4.1.1	Estudio exploratorio	46
4.1.2	Estudio experimental	46
4.2	Caracterización de las condiciones de almacenamiento	47
4.3	Universo y muestra	47
4.3.1	Universo	47
4.3.2	Muestra	48
4.3.3	Sitio de recolección de muestras	48

4.3.4 Muestreo y variables de medición	48
4.3.5 Traslado de muestras al laboratorio de análisis microbiológico	51
4.3.6 Almacenamiento de las muestras y testigos	51
4.4. Diseño del experimento	52
4.4.1 Reconstitución de la levadura probiótica	53
4.4.2 Estandarización de la levadura probiótica	53
4.4.3 Aplicación de levadura probiótica a granos de café oro y café pergamino	54
4.4.4. Secado de los granos de café oro y café pergamino	55
4.5 Variables de Medición en los días de análisis	55
4.5.1 Determinación del porcentaje de humedad	56
4.5.2 Identificación de hongos productores de ocratoxina A, en granos de café oro y café pergamino.	56
4.5.2.1 Cuantificación de hongos productores de ocratoxina A en muestras de café oro y café pergamino	57
4.5.2.2 Identificación de hongos productores de ocratoxina mediante el uso de microscopio	58
4.5.3 Cuantificación de la presencia de Ocratoxina A en granos de café oro y café pergamino	58
4.6 Determinación de las características organolépticas del producto final	59
4.7 Análisis costo-efectividad	61
4.8 Variables de medición y análisis estadístico	61
4.8.1 Variables respuestas	61
4.9 Análisis estadístico	62

## CAPÍTULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	64
5.1 Caracterización de las condiciones de almacenamiento y los granos de café oro y pergamino	64
5.2 Resultados de la aplicación de la levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i>	87
5.2.1 Cuantificación e identificación de hongos productores de ocratoxina A, en granos de café oro y pergamino	94
5.2.1.1 Cuantificación de hongos productores de ocratoxina A en muestras de café.	94
5.3 Relación del crecimiento de colonias de <i>Aspergillus</i> con el aumento de humedad	105
5.4 Cuantificación de la presencia de Ocratoxina A en granos de café oro y pergamino	107
5.5 Determinación de las características sensoriales de los granos de café oro y pergamino	112
5.6 Análisis costo-efectividad de la aplicación del método con <i>Saccharomyces boulardii</i>	112

## CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES	116
--------------	-----

## CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES	119
-----------------	-----

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

## GLOSARIO

## ANEXOS

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro No.</b>		<b>Página</b>
1	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 1.	65
2	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 2.	67
3	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 3.	69
4	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 4.	71
5	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 5.	73
6	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 6.	75
7	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 7.	77
8	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 8	79
9	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 9	81
10	Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 10	83

11 Variaciones identificadas en la caracterización de los granos de café oro y café pergamino.	87
12 Resultados de la medición de humedad en granos de café pergamino, al inicio y final de la investigación.	88
13 Resultados de la medición de humedad en granos de café oro, al inicio y final de la investigación.	91
14 Promedio de crecimiento de colonias de hongos productores de ocratoxina al día cero, en granos de café pergamino.	95
15 Promedio de crecimiento de colonias de hongos productores de ocratoxina al día cero, en granos de café oro.	95
16 Promedio de crecimiento de colonias de hongos productores de ocratoxina al día quince, en granos de café pergamino.	96
17 Promedio de crecimiento de colonias de <i>Aspergillus niger</i> al día quince, en granos de café oro.	97
18 Promedio de crecimiento de colonias de <i>Aspergillus niger</i> al día cincuenta y seis, en granos de café pergamino.	98
19 Promedio de crecimiento de colonias de <i>Aspergillus niger</i> al día cincuenta y seis, en granos de café oro.	99
20 Promedio de crecimiento de colonias de <i>Aspergillus niger</i> al día sesenta, en granos de café pergamino.	99
21 Promedio de crecimiento de colonias de <i>Aspergillus niger</i> al día sesenta, en granos de café oro.	100

22 Promedio de crecimiento de colonias de <i>Aspergillus niger</i> al día noventa en granos de café pergamino.	101
23 Promedio de crecimiento de colonias de <i>Aspergillus niger</i> al día noventa en granos de café oro.	102
24 Resumen de promedios de crecimiento de colonias de <i>Aspergillus niger</i> durante los 90 días del análisis.	103
25 Crecimiento de colonias de <i>Aspergillus</i> spp y su relación con la humedad al inicio y final de la investigación en café pergamino.	105
26 Crecimiento de colonias de <i>Aspergillus</i> spp y su relación con la humedad al inicio y final de la investigación en café oro.	106
27 Recuento de OTA durante el día cero, en granos de café pergamino después de la aplicación de <i>S. boulardii</i> .	108
28 Recuento de OTA durante el día quince, en granos de café pergamino después de la aplicación de <i>S. boulardii</i> .	108
29 Recuento de OTA durante el día noventa, en granos de café pergamino después de la aplicación de <i>S. boulardii</i> .	109
30 Recuento de OTA durante el día cero, en granos de café oro después de la aplicación de <i>S. boulardii</i> .	109
31 Recuento de OTA durante el día quince, en granos de café oro después de la aplicación de <i>S. boulardii</i> .	110
32 Recuento de OTA durante el día noventa, en granos de café oro después de la aplicación de <i>S. boulardii</i> .	111

33	Porcentaje promedio de efectividad y sus costos variables por tipo de tratamiento.	113
34	Tratamientos con cada día de medición para OTA para determinar el Índice Costo-Efectividad.	113
35	Ficha técnica para caracterización de lotes de café.	132
36	Procedimiento para recolección de muestras de café.	135
37	Etiqueta de identificación de muestras de café oro y pergamino.	138
38	Ficha Técnica para toma de datos al momento del muestreo.	139
39	Cantidad de muestras a recolectar y su distribución por tiempo de análisis y tratamiento de aplicación.	140
40	Protocolo para la catación del café como producto terminado.	157

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla No.</b>		<b>Página</b>
1	Número de muestras a tomar de acuerdo al tamaño de lote.	49
2	Cantidad de muestra recolectadas.	50
3	Variables de medición para cada uno de los tiempos de análisis.	51
4	Descripción de los tratamientos a aplicar al café oro y pergamino.	52
5	Materiales a utilizar para la medición de humedad en granos de café.	160
6	Materiales a utilizar para la determinación e identificación de hongos productores de ocratoxina A, en granos de café.	160
7	Materiales a utilizar para el recuento de Ocratoxinas.	161
8	Materiales a utilizar para la reconstitución de Levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> .	162
9	Materiales a utilizar para la estandarización de Levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> .	163
10	Materiales a utilizar para la aplicación de Levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> .	164

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Estructura del fruto y grano de café.	28
2	Maquina despulpadora de café.	29
3	Patio de secado de café pergamino.	31
4	Granos de café en bandejas de secado después de la aplicación de la levadura probiótica.	88
5	Resultados obtenidos de la medición del porcentaje de humedad en granos de café pergamino al inicio (día cero) y final de la investigación (día noventa).	90
6	Resultados obtenidos de la medición del porcentaje de humedad en granos de café oro al inicio y final de la investigación.	93
7	<i>Aspergillus</i> visto al microscopio.	104
8	<i>Aspergillus</i> anatomía microscópica.	105
9	Mapa de ubicación del beneficio Tuxpal.	134
10	Ubicación geográfica del beneficio Tuxpal.	134
11	Reconstitución de la levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> .	147
12	Estandarización de la levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> , mediante el método espectrofotométrico.	148
13	Aplicación de levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> en muestras de café oro y café pergamino.	149

14	Determinación del porcentaje de húmeda para granos de café oro y café pergamino.	150
15	Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).	151
16	Cuantificación de hongos productores de ocratoxina A, en muestras de granos de café oro y café pergamino	152
17	Identificación de hongos productores de ocratoxina mediante tinción al fresco.	153
18	<i>Penicillium sp</i> visto al microscopio.	154
19	<i>Aspergillus sp</i> visto al microscopio.	154
20	Flujograma para la determinación de Ocratoxina A en granos de café oro y café pergamino utilizando el kit AgraQuant® ELISA.	156
21	Ficha técnica del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa.	166
22	Ficha técnica del kit para la determinación de Ocratoxina.	168
23	Certificado del kit para la determinación de Ocratoxina.	169

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo No.

1. Ficha técnica para caracterización de lotes de café.
2. Ubicación geográfica del beneficio Tuxpal.
3. Procedimiento para recolección de muestras de café.
4. Etiqueta de identificación de muestras de café oro y pergamino.
5. Ficha Técnica para toma de datos al momento del muestreo.
6. Cantidad de muestras a recolectar y su distribución por tiempo de análisis y tratamiento de aplicación.
7. Reconstitución de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*.
8. Estandarización de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, mediante el método espectrofotométrico.
9. Aplicación de levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* en muestras de café oro y café pergamino.
10. Determinación del porcentaje de húmeda para granos de café oro y café pergamino.
11. Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).
12. Cuantificación de hongos productores de ocratoxina A, en muestras de granos de café oro y café pergamino.
13. Identificación de hongos productores de ocratoxina mediante tinción al fresco.
14. *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* vistos al microscopio.

15. Flujograma para la determinación de Ocratoxina A en granos de café oro y café pergamino utilizando el kit AgraQuant® ELISA.
16. Protocolo para la catación del café como producto terminado.
17. Materiales que utilizar para la medición de humedad en granos de café.
18. Ficha técnica del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa.
19. Ficha técnica del kit para la determinación de Ocratoxina.
20. Certificado del kit para la determinación de Ocratoxina.

## ABREVIATURAS

<b>Abs</b>	Absorbancia.
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza.
<b>aw</b>	Actividad del agua.
<b>APE</b>	Agua Peptonada Estéril.
<b>C/E</b>	Costo efectividad
<b>IARC</b>	Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer.
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alto desempeño.
<b>S<sup>2</sup></b>	Desviaciones cuadráticas
<b>Sd</b>	Desviación Estándar
<b>DL50</b>	Dosis letal media.
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.
<b>spp</b>	Especie
<b>ECF</b>	Federación Europea del Café.
<b>°C</b>	Grados Celsius.
<b>g</b>	Gramos.
<b>kg</b>	Kilogramos.
<b>Kda</b>	Kilodalton.
<b>µg</b>	Microgramos.
<b>µL</b>	Microlitros.

<b>mg</b>	Miligramos.
<b>mL</b>	Mililitros.
<b>N/A</b>	No Aplica.
<b>OTA</b>	Ocratoxina A.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
<b>ISO</b>	Organización Internacional para la Estandarización.
<b>ppb</b>	Partes por billón.
<b>pH</b>	Potencial de iones hidrógeno.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>Tc</b>	T calculado
<b>UFC/g</b>	Unidades Formadoras de Colonias por gramo.

## RESUMEN

La Ocratoxina A es tan peligrosa, que expertos de la FAO y la OMS han establecido un límite máximo tolerable para los humanos de 100 milmillonésimos de gramo por kilogramo de peso corporal a la semana. La Unión Europea estableció límites máximos admisibles para la OTA de 5 ppb en el café tostado y molido, y 10 ppb en el café instantáneo.

En El Salvador el promedio de consumo de café local ronda alrededor del 28%. Para la cosecha 2017-2018 se consumió un total de 391,000 quintales; durante el año económico de 2019-2020, en El Salvador se consumieron 18 millones de kilogramos de café, esto significa, que el consumo promedio de café en El Salvador per cápita es de alrededor de 2.8 kg, lo cual se considera como medio alto entre los países productores de América Latina, en relación a lo anterior y sabiendo que el café producido localmente, así como, el café obtenido de las importaciones no cuentan con registros que aseguren que el café para consumo local esté libre de microorganismos que perjudiquen la salud humana, se realizó un estudio de tipo experimental basado en la aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* a la concentración de  $10^8$  células de levadura/mL por 15 minutos en la reducción de colonias de *Penicillium* y *Aspergillus* en granos de café oro y pergamino recolectadas en cuartos de almacenamiento de una exportadora de café, se cuantificó la disminución de la concentración de ocratoxina A en granos de café oro y pergamino. El estudio se realizó con muestras de café oro y café pergamino, las cuales se caracterizaron con el uso de una ficha técnica que permitió recabar datos relacionados a las condiciones de almacenamiento. La parte experimental con un diseño completamente al azar con arreglo factorial y con una repetición; En dicho experimento, se aplicó la levadura probiótica (*Saccharomyces boulardii* a una concentración de  $10^8$  células de levadura/mL por un tiempo de 15 min.) a muestras de café oro y café pergamino. Las muestras y controles fueron

resguardados a condiciones de temperatura ambiente y extraídas para su análisis durante los días 0, 15, 56, 60 y 90, realizando las determinaciones correspondientes a porcentaje de humedad, recuento total de mohos y levaduras, identificación de hongos ocratoxigénicos y cuantificación de OTA.

Se evidenció al día 15 de evaluación el grado de protección que *Saccharomyces boulardii* tiene sobre los granos de café en condiciones de temperatura ambiente. En cuanto a las características sensoriales de los granos de café oro y café pergamino no fue posible efectuarse, debido a la pandemia por Covid-19, por lo que queda la incertidumbre en función de determinar si la levadura probiótica puede o no afectar las características sensoriales del café y si esto puede o no favorecer la aceptabilidad por parte del consumidor final. Por otra parte, se realizó un análisis costo efectividad para determinar el tratamiento con mayor efectividad, seleccionando el índice C/E igual al valor cero o el valor más bajo, aceptando los tratamientos 1 y 2 al día 15 del análisis.

Es recomendable que en El Salvador se establezca un centro de vigilancia sanitaria, enfocado en realizar monitoreo continuo de los niveles de ocratoxinas y otras micotoxinas, que se encuentran contenidas en los alimentos de consumo salvadoreño, el cual tenga como principal objetivo, prevenir la aparición de enfermedades asociadas con el consumo de alimentos con potencial contenido de toxinas.

Los 15 días de Protección que brinda la aplicación de la levadura probiótica ante hongos productores de OTA en condiciones de temperatura ambiente permite al caficultor un período de ventana por cualquier condición de clima no favorable.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de la empresa AgroBioTek El Salvador, al igual que en el área de beneficio y tostaduría de una empresa exportadora de café, en el periodo de septiembre de 2019 a noviembre de 2020.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUCCIÓN**

## 1.0 INTRODUCCIÓN

El café ha sido y sigue siendo uno de los principales cultivos dentro del agro de El Salvador, las etapas de su procesamiento presentan una serie de actividades que implican un control, por lo que la aplicación de prácticas de conservación inadecuadas o deficientes durante el proceso de recolección pueden perjudicar la calidad del producto y ocasionar pérdida de la calidad e inocuidad del grano, resultando como no apto para el consumo humano.

La permanencia del grano de café con altos contenidos de humedad (humedad superior al 12%), los tiempos prolongados de los procesos, el contacto con la pulpa y los residuos, así como, los ambientes húmedos y las altas temperaturas en el almacenamiento, son condiciones de riesgo que generan un ambiente propicio para la aparición de hongos ocratoxigénicos como son hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, que pueden dar lugar a la presencia de ocratoxinas, que por su gran estabilidad química, se mantienen intactas durante la preparación industrial de los alimentos, llegando al ser humano por la ingestión de granos contaminados, las cuales pueden afectar la salud de las personas, mediante la manifestación de enfermedades como hepatitis toxica, cáncer en el esófago e hígado.

Lo anterior, dio lugar a la búsqueda de nuevas alternativas para la protección de los granos de café, considerando que la aplicación de desinfectantes a lo largo del proceso del beneficiado propician que el grano de café se vea afectado por la presencia de aditivos que cambian el aspecto, color, aroma y textura natural del producto, en vista de tal situación, se realizó un estudio, en el que se evaluó aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* a una concentración de  $10^8$  células de levadura/mL por un tiempo de 15 minutos, los granos de café, fueron secados y resguardados a condiciones de temperatura ambiente y durante los días 0, 15, 56, 60 y 90 se efectuaron las

determinaciones correspondientes a porcentaje de humedad, recuento total de hongos y levaduras, identificación de hongos ocratoxigénicos y cuantificación de ocratoxina A mediante la prueba para la determinación de ocratoxina A AgraQuant<sup>®</sup> ELISA; se evaluaron las muestras controles, tanto de café oro como de café pergamino, para comparar los resultados obtenidos. Se efectuó un análisis de costo efectividad que permitió determinar el tratamiento con mayor efectividad seleccionando aquel cuyo índice C/E es igual al valor cero o el valor más bajo. Dado el caso se aceptaron los tratamientos 1 y 2 al día 15 de la investigación, con valores de 0.051 y 0.044 respectivamente.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de la empresa AgroBiotek El Salvador, al igual que en el área de beneficio y tostaduría de una empresa exportadora de café, en el periodo de septiembre de 2019 a noviembre de 2020.

**CAPÍTULO II**  
**OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la aplicación de *Saccharomyces boulardii* en la reducción de colonias de *Penicillium* y *Aspergillus* en granos de café oro y pergamino.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

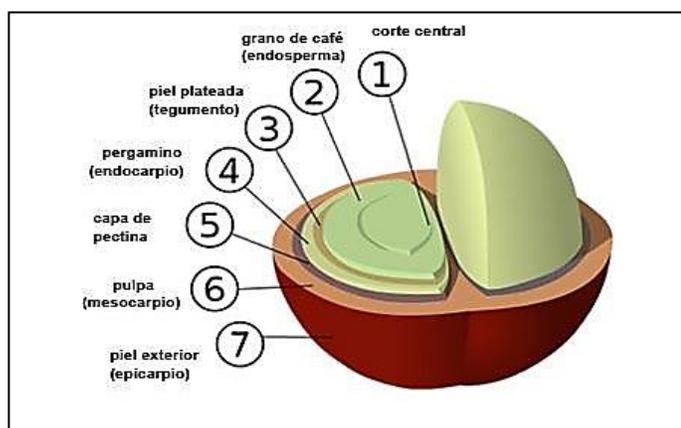
- 2.2.1 Caracterizar las condiciones de almacenamiento del grano de café oro y pergamino mediante la utilización de una ficha técnica.
- 2.2.2 Aplicar la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* y cuantificar la concentración de ocratoxina A en granos de café oro y pergamino.
- 2.2.3 Identificar la presencia de hongos productores de ocratoxina (*Aspergillus* y *Penicillium*) en granos de café oro y pergamino mediante la utilización de pruebas de identificación.
- 2.2.4 Cuantificar la presencia de ocratoxina A en granos de café oro y pergamino en las etapas de almacenamiento de beneficio y tostaduría, mediante la prueba para la determinación de ocratoxina A AgraQuant<sup>®</sup> ELISA.
- 2.2.5 Determinar las características sensoriales del café a través de la catación del producto final con catadores certificados de la Asociación Salvadoreña de Catadores de Café.
- 2.2.6 Realizar un análisis costo-efectividad del método de protección aplicado con respecto a los métodos convencionales, para determinar si la aplicación del método con *Saccharomyces boulardii*, es efectivo con relación a costo y reducción de ocratoxina A.

**CAPÍTULO III**  
**MARCO TEÓRICO**

### 3.0 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Fruto del café.

El fruto de café está constituido por las siguientes partes: Epicarpio o epidermis, mesocarpio o pulpa, endocarpio o pergamino y endospermo o semilla (Ver Figura No. 1). La mayor parte de la semilla la constituye el endospermo que es de consistencia dura y color verdoso. El embrión que formará la futura planta se localiza dentro de la semilla al nivel de la base con apariencia de una pequeña paleta de aproximadamente 4 mm de largo y una tonalidad cremosa que trasluce dentro de la semilla <sup>(22)</sup>.



**Figura No. 1** Estructura del fruto y grano de café.

#### 3.2 Beneficiado del café.

El beneficiado es un proceso agroindustrial para transformar los frutos del cafeto de su estado uva a café oro.

El proceso de beneficiado se realiza en dos fases: la primera, es la fase húmeda la cual termina con la obtención de café pergamino, la segunda, es la fase seca y su etapa final da como producto el café oro con un porcentaje de humedad del 12%. <sup>(22)</sup>.

### 3.3 Fase húmeda.

El beneficio por vía húmeda se inicia con una recolección o cosechamiento cuidadoso, repitiendo la selección una y otra vez de acuerdo con el tamaño, densidad y grado de madurez, para asegurarse que las cerezas recolectadas sean la más maduras y solamente unas pocas estén sobre o medio maduras. Luego de un lavado preliminar durante el cual se pueden separar por flotación algunas cerezas de inferior calidad, y los materiales extraños. Las cerezas son sometidas a una operación tecnológica conocida como despulpado (Ver Figura No. 2); en donde se remueve mecánicamente el exocarpio y en cuanto sea posible el mesocarpio. La despulpadora puede ser de disco o de tambor rotatorio con orificios, la función es la de aprisionar las cerezas entre dos superficies, una de ellas en continuo movimiento y otra fija para retirar el exocarpio y el mesocarpio. La separación entre las dos superficies se debe ajustar finamente para realizar el máximo de remoción de la pulpa sin llegar a causar daño en el grano.



**Figura No. 2** Maquina despulpadora de café.

En otros procesos los granos pasan a través de un separador rotativo o un tamiz para remover cualquier residuo de pulpa existente; también pueden ir a un segundo despulpado. Esta pulpa es generalmente depositada en sitios adecuados para su descomposición hasta formar un compost o mulch con el fin

de servir como abonos orgánicos, o también puede ser secada al sol para ser usada como combustible en el secado del mismo café.

El siguiente estado es conocido como fermentación, en donde se elimina el mucílago que generalmente permanece adherido al endocarpio (pergamino); y es retirado por fermentación enzimática y posterior lavado que es llevado a cabo en tanques de concreto.

Generalmente los granos son desmucilaginosos por degradación enzimática natural por las enzimas presentes en el mucílago. Este proceso demora cerca de 72 horas, pero puede ser acelerado con la adición de preparados enzimáticos pépticos.

La fermentación es completa cuando los granos dejan de deslizarse fácilmente entre los dedos dejando una sensación áspera ligera. Entonces los granos están listos para ser lavados completamente con agua limpia y seguir a la etapa de secado.

### **3.4 Secado del café.** <sup>(22)</sup>

El secado del café es una de las actividades más importantes y consiste en disminuir el porcentaje de humedad del pergamino, este proceso es llevado a cabo en patios de concreto para ser secados al sol (Ver Figura N<sup>o</sup>.3); formando capas de 5 centímetros de espesor, las cuales son removidas y giradas varias veces al día para hacer eficiente el secado. Generalmente toma entre tres y cuatro semanas reducir el contenido de la humedad del grano hasta el 12 %, quedando el grano listo para las siguientes etapas, porcentaje al cual debe almacenarse para su comercialización. Cuando la humedad del grano es superior al 12%, favorece la proliferación de hongos; mientras que humedades menores, provocan la decoloración del grano y pérdida de peso.

El secado del café es una fase crítica y de transición entre el grano húmedo y el grano seco, una vez finalizado el proceso de secado con humedad menor al 12.5% no se pueden formar mohos, pero los niveles intermedios de humedad son un clima favorable para la formación ocratoxina A. En la industria cafetera

el secado del café suele ser extendido en el suelo para que se seque por acción solar, sin embargo, un factor no controlable son las lluvias y percances climáticos que no son considerados; esto aumenta el tiempo de secado considerablemente lo que implica una proliferación de hongos mayor.



**Figura No. 3** Patio de secado de café pergamino.

Una vez que el grano está seco se suele almacenar por varias semanas, pudiendo ser hasta meses, en el cual, un requisito para evitar la formación de mohos es mantener la humedad que obtuvo el grano una vez terminado su proceso de secado, no obstante, hay estudios realizados, en los que se ha observado que en pequeños agricultores, no mantienen la humedad del producto durante el almacenamiento y el grano se rehidrata llegando a niveles mayores al 12.5 %, lo cual incrementa nuevamente la probabilidad de formación de micotoxinas. <sup>(22)</sup>

### **3.5 Trilla del café pergamino.**

El objeto de esta operación es el retiro de la envoltura que recubre el grano denominada pergamino y es llevada a cabo en una maquina trilladora la cual generalmente consta de un tornillo alimentador que obliga a los granos a pasar a través de un espacio reducido, sometiendo el grano a fricción, desprendiendo

la película recubridora que asemeja un plástico. En algunas trilladoras se requiere que los granos hayan sido previamente clasificados por tamaño en tamices vibratorios; además se hace necesario el uso de separadores neumáticos para dejarlos libres de impurezas como materiales vegetales, piedras y piezas metálicas que pueden generar daños en la máquina. Después que los granos salen de estos separadores son destinados directamente a la exportación o al consumo nacional, es decir se deben clasificar por calidades. (Granos de tamaño, apariencia y forma similar).

### **3.6 Almacenamiento del café.**

El almacenamiento del café tiene como propósitos: el acopio de café pergamino o cereza previo a la trilla, la cual se planifica de acuerdo con las proyecciones de venta. <sup>(22)</sup>

El café como todos los productos naturales después de ser recolectados, beneficiados, secados y empacados en sacos (café pergamino) son almacenado por diferentes periodos de tiempo y en sitios con diferentes condiciones climatológicas, y como todos los granos que en mayor o menor grado son perecederos, su perfecta conservación depende de los factores tales como: temperatura y humedad de la atmósfera de almacenamiento; de la temperatura, humedad y de las condiciones físicas, químicas y microbiológicas de los granos de café y del aire.

En esta etapa se deben tener los siguientes cuidados:

Controlar temperatura entre 18 a 20°C, humedad relativa entre 60 a 65% y circulación de aire, esto último es mucho más importante cuando se almacena en trojas de madera.

Usar tarimas de madera cuando se almacena en sacos y estibarlos por partida. Identificarlos según fecha de ingreso al beneficio y de acuerdo con los resultados de catación.

Supervisión y muestreos de partidas para detectar broca del fruto del cafeto, otros insectos u hongos.

### **3.6.1 Estado sanitario del café.**

Los factores que influyen en el estado sanitario del café son: insectos, microorganismos, roedores y contaminantes.

La contaminación del café y su deterioro es causada por: infestación de roedores, insectos y ácaros, contaminación por polvo y olores extraños, así como por el ataque microbiano y la actividad enzimática.

Entre los principales microorganismos que infestan el café almacenado se encuentran algunas bacterias y mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

Las condiciones que favorecen la proliferación de los microorganismos durante el almacenamiento son: temperaturas mayores de 20°C, elevada humedad relativa, presencia de gorgojo, mala calidad microbiológica del grano, estado deficiente de bodegas y silos.

Los hongos de almacén son especies como *Aspergillus* y *Penicillium*, que causan diversos daños a los granos y semillas almacenadas, siendo los más sobresalientes la reducción del poder germinativo de las semillas, el ennegrecimiento de los granos y la producción de micotoxinas <sup>(11)</sup>.

### **3.7 Micotoxinas.**

El hombre conoce los hongos que crecen en los alimentos desde la antigüedad, y los ha utilizado en su propio beneficio como alimento directo, para mejorar alimentos y especialmente con fines terapéuticos (antibióticos). Sin embargo, el estudio de los hongos como tóxicos no se inició hasta los años 60, como consecuencia de una intoxicación masiva que provocó la muerte de 100.000 pavos, y que se encontró asociada a una contaminación por hongos. Ciertas especies fúngicas son capaces de producir unos metabolitos secundarios con

carácter tóxico llamadas micotoxinas. La segregación de estas sustancias se produce bajo ciertas condiciones ecológicas favorables.

El interés de los hongos y las micotoxinas es enorme, no sólo desde el punto de vista científico, sino desde la perspectiva económica. Son muchos los problemas que originan, desde el agricultor hasta el consumidor final. Por ejemplo, las bajadas de rendimientos de las cosechas, los empeoramientos en los índices técnicos de los animales de granja, enfermedades en los mismos, alteraciones en los alimentos, pérdidas de características organolépticas y nutricionales, costes derivados de la prevención o el tratamiento descontaminante por citar algunos de ellos. <sup>(27)</sup>

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos que pueden producir propiedades tóxicas, carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas y estrogénicas. El término micotoxina se deriva de las palabras griegas: *mykes* (hongos) y *toksikon* (veneno). Las micotoxinas tienen propiedades químicas diversas, poco solubles en agua, muy resistentes a su desactivación por medios físicos, químicos y biológicos. <sup>(22)</sup>

Existen más de 400 micotoxinas descritas, pero solamente un aproximado de 12 han sido experimentalmente documentadas como nocivas para la salud humana y animales domésticos. <sup>(27)</sup>

### **3.7.1 Condiciones de contaminación.**

El desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas requieren ciertas condiciones ambientales, entre ellos los siguientes:

Factores físicos: humedad y agua disponible, temperatura, zonas de microflora (pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad), e integridad física del grano o del alimento.

Actividad de Agua: el concepto de actividad de agua o agua disponible, normalmente designada como *aw*. La *aw* indica la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos, una vez se ha alcanzado el equilibrio

hídrico en el sistema alimento/medio ambiente. La  $a_w$  se expresa como la relación existente entre la tensión de vapor de agua en el sustrato (P) y la del agua pura ( $P_o$ ), a la misma temperatura, ( $a_w = P/P_o$ ). El agua pura tiene una actividad de agua igual a 1. En los alimentos, la  $a_w$  será siempre inferior a 1. La mayor parte de los hongos que contaminan los cereales, por ejemplo, necesitan valores superiores a 0.7.

Factores químicos: Composición del sustrato, pH, nutrientes minerales y disponibilidad de oxígeno.

Factores biológicos: Presencia de invertebrados y estirpes específicas (en una misma especie fúngica existen estirpes productoras de micotoxinas y otras que son incapaces de producirlas). <sup>(27)</sup>

### 3.7.2 Principales micotoxinas.

Dentro de la gran variedad de hongos existentes, son pocos los que juegan un papel importante en el campo zootécnico.

Las micotoxinas son producidas principalmente por 5 tipos de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* y *Alternaria*.

Los hongos que invaden los granos pueden clasificarse en dos grupos diferentes:

Hongos de campo: invaden los granos antes de la cosecha o tras la siega (siempre previo a la trilladora). Incluye distintas especies que requieren altos niveles de humedad en el grano (20-22%). Son típicos los géneros *Alternaria* y *Fusarium*.

Hongos de almacenaje: invaden el grano a contenidos inferiores de humedad. Géneros como *Aspergillus* y *Penicillium*. Muchos hongos no son productores de micotoxinas incluso pudiendo invadir el grano, por lo que un grano enmohecido no tiene por qué ser necesariamente tóxico. Del mismo modo, puede detectarse una micotoxina sin la presencia del hongo productor, ya que éste puede haber

sido inactivado por procesos químicos o por alteración de los factores ambientales mientras las micotoxinas permanecen en el sustrato.

Hasta el momento, se han identificado más de 200 tipos de micotoxinas. Sin embargo, las que pueden encontrarse con mayor frecuencia como contaminantes naturales en los alimentos para animales o humanos son las siguientes: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 M1), ocratoxinas, zearalenona, tricotecenas (vomitoxina, T-2, nivalenol, DON), citrinina, patulina y fumosinas (B1 y B2). <sup>(27)</sup>

### **3.7.3 Clasificación y toxicidad.**

Existen varios tipos de ocratoxinas, pero la ocratoxina A es la más frecuente en alimentos y la que presenta mayor toxicidad. La ocratoxina A está clasificada como “posiblemente cancerígena para el ser humano” por sus propiedades carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas siendo específicamente nefrotóxica e inmunotóxica. <sup>(15)</sup>

En todas las especies animales estudiadas la OTA se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal y se elimina lentamente. Su biodisponibilidad en las especies de mamíferos es superior al 50 %. La OTA presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, siendo la fracción de toxina libre en plasma.

La toxicidad aguda de la OTA es relativamente baja y muestra variaciones interespecíficas. La DL50 por vía oral se encuentra en un intervalo entre aproximadamente 20 y 50 mg/kg en ratas y ratones; hasta 0.2-1 mg/kg en perros, cerdos y pollos, que son las especies más sensibles. Los síntomas de la intoxicación aguda consisten en hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón, así como nefrosis y necrosis hepática y en el tejido linfoide. Existe descrito únicamente un caso de intoxicación aguda en el ser humano.

El consumo crónico de OTA produce nefropatía intersticial en los animales de granja, como pollos y cerdos, que puede causar importantes pérdidas económicas. A pesar de las diferencias en cuanto a la toxicocinética en diversas especies, las lesiones renales en cerdos, aves y roedores son muy similares. En el ser humano se ha relacionado con la etiología de una nefropatía que es endémica en la zona de los Balcanes, debido a que presenta una gran semejanza histopatológica con la que se produce en los animales y a que la exposición a OTA parece ser muy alta en esa zona geográfica comparada con otras. Se trata de una enfermedad renal crónica y progresiva que representa actualmente el 11 % de todas las enfermedades primarias diagnosticadas en la antigua Yugoslavia. Se caracteriza por una neuropatía túbulo-intersticial progresiva, que deriva en una atrofia tubular y fibrosis periglomerular, entre otros síntomas. Esta enfermedad se acompaña a veces de tumores malignos del tracto urinario superior que resultan muy agresivos. Algunos estudios indican una incidencia ligeramente más elevada de esta enfermedad en las mujeres. Si bien la hipótesis no está comprobada, algunos estudios realizados en Francia, Túnez y Egipto indican una relación entre la ingesta de OTA a través de la dieta y el desarrollo de tumores renales y uroteliales.

#### **3.7.4 Vías de transmisión alimentaria.**

La ocratoxina A puede entrar en la cadena alimentaria transmitiéndose al ser humano:

Directamente a través del consumo de alimentos vegetales (cereales y productos a base de cereales, café, cacao, frutos secos, frutas y sus productos derivados).

Indirectamente a través del consumo de productos derivados de animales que han consumido pienso contaminado con ocratoxina A.

La producción de micotoxinas está asociada a las condiciones que favorecen el desarrollo del hongo que las produce. Si bien existen diferencias entre las distintas especies, los hongos productores de micotoxinas pueden crecer, de forma general, en rangos de temperatura entre 3° C y 40°C, a pH entre 2-10 y por encima de 0.77-0.99 de actividad de agua. <sup>(15)</sup>

### **3.7.5 Métodos para la cuantificación de ocratoxinas.**

Las ocratoxinas y las aflatoxinas se encuentran algunas veces en muy bajas concentraciones en los alimentos, requiriendo de métodos de cuantificación que sean sensibles, confiables, con alto grado de sensibilidad y reproducibilidad. Entre los métodos de cuantificación más utilizados se encuentran los basados en separación: como el HPLC con detección por espectrofotometría, fluorometría acoplado con espectrometría de masas, cromatografía en capa fina con densitometría de manchas fluorescentes, cromatografía de gas y electroforesis capilar; y los inmunoensayos, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima.

## **3.8 Riesgo y recomendaciones para prevenir la ocratoxina A en café.** <sup>(22)</sup>

### **3.8.1 Campo y beneficiado.**

*Aspergillus ochraceus*, rara vez se presenta en frutos maduros al momento de la cosecha. Los frutos frescos no son propensos al desarrollo de *Aspergillus*. Los granos afectados por la broca del café muestran mayor frecuencia de infección alta de *Aspergillus*. Durante la fermentación normalmente se reduce la presencia de *Aspergillus* a favor de las levaduras.

### **3.8.2 Secado del café.**

En el secado adecuado disminuye la posibilidad de formación de mohos. Cuando el secado de los granos se realiza por métodos mecánicos el riesgo de

contaminación es bien bajo, sin embargo, cuando el secado de los granos se realiza en patios o al medio ambiente libre, el secado debe reducir la humedad del grano en los primeros 3 o 4 días hasta 18–20% de humedad. Por lo que es importante que se considere evitar la recuperación de humedad del grano.

### **3.8.3 Almacenamiento.**

Mantener temperaturas máximas de 20°C y humedad relativa entre 55 y 65% para conservar la humedad del café entre 10 y 11% por tiempo indefinido. Estudios de laboratorio han documentado que el contenido de humedad del grano en equilibrio y con humedad relativa de 85% es el límite más bajo para el crecimiento de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. *Penicillium viridicatum* produce ocratoxina en el más alto nivel de humedad en granos por el crecimiento como lo hace *Aspergillus flavus*. La formación de toxina puede esperarse en el amplio rango de temperatura de 10–40°C y pH 4–7. En regiones donde la temperatura ambiental es menor de 15°C hay poco problema de desarrollo de hongos y de micotoxinas. Bajo condiciones de laboratorio entre 25–30°C la aflatoxina se desarrolla en 48 horas en nueces húmedas, arroz áspero y semillas de algodón, y en un periodo mínimo de 4–5 días en avena.

### **3.9 Calidad sanitaria del grano de café y reglamentaciones.**

La presencia de ocratoxina A en el café, en Europa está siendo aceptado hasta con cinco o seis partes por millón (ppm), por otra parte, en septiembre de 2004, la Organización Mundial del Comercio propone niveles máximos para la Ocratoxina A en el café tostado y molido de 5 µg/kg <sup>(5)</sup>, y en el café soluble de 10 µg/Kg. El café de mala calidad que muchas veces queda para el consumo interno no debería consumirse, ya que éste presenta los mayores índices de presencia de ocratoxina, que en altas concentraciones provoca daños a la salud. <sup>(4, 5)</sup>

La presencia de ocratoxina A en el café se descubrió apenas en 1988<sup>(4)</sup>, poco después, que la Unión Europea pusiera en marcha un programa de armonización de los reglamentos sobre la presencia de micotoxinas en los alimentos, que comprendía establecer la concentración máxima de ocratoxina A en el café. Estas medidas crearon conmoción en la industria del café, cuyo valor ronda los 70,000 millones de dólares al año. Un estudio encargado por la Federación Europea del Café (ECF) que representa a los importadores de café verde, la torrefacción y la producción de café instantáneo, reveló que el límite establecido para la Ocratoxina A es de 5 ppb lo que podría dar lugar al rechazo del 7% de las importaciones de café verde, y que todos los países exportadores de café sufrirían las repercusiones <sup>(4)</sup>. Se ha establecido un límite máximo tolerable para los humanos, en el caso de micotoxinas el valor es de 100 nanogramos por kilogramo de peso corporal semanal. Para el año 2004, la Unión Europea también estableció límites máximos admisibles para la ocratoxina A de 5 ppb en el café tostado y molido y de 10 ppb en el café instantáneo. <sup>(4)</sup>

En 1996, Italia estableció el título de recomendación el valor de 4 µg/kg como límite para ocratoxina A y Grecia adoptó 20 µg/kg como límite, ambos para café verde. La República Checa reglamentó en 20 µg/kg y Rumania en 5 µg/kg el límite de ocratoxina A en todos los alimentos.

Otro punto que se pudo obtener en la investigación de la FAO <sup>(4)</sup> es que los granos más defectuosos poseen una mayor cantidad de toxina que los normales, pero generalmente los granos defectuosos y el café de peor calidad suele ser consumido por la población local, estas acciones dan una idea del peligro que conlleva el desconocimiento de las Buenas Prácticas Agrícolas en países en vías de desarrollo.

### **3.10 Métodos de protección contra la contaminación en alimentos.**

El almacenaje y manipulación inadecuados de los alimentos como el café para consumo pueden determinar un número significativamente más grande de microorganismos que pueden estar presentes antes de la cocción, poniendo en riesgo la inocuidad del alimento y la salud del consumidor, por lo tanto la aplicación de métodos de protección que ayuden a contrarrestar la existencia de microorganismos patógenos, se vuelve fundamental en el momento del procesamiento y en las etapas críticas donde se pone en juego la inocuidad de los granos de café, por lo que teniendo en cuenta que la aplicación de un buen método de protección para los granos de café puede evitar la contaminación de los mismos, se vuelve fundamental poder explicar el fundamento de los métodos de protección, los cuales según la literatura y de estudios realizados en investigaciones anteriores nos demuestran el efecto que se realiza en ciertos tipos de alimentos, cuando éstos son aplicados en las condiciones adecuadas, por lo tanto se explica a continuación la aplicación de una levadura probiótica y la aplicación de luz ultravioleta.<sup>(3)</sup>

#### **3.10.1 Levadura probiótica.**

Los aditivos de levaduras han sido empleados como alimento por más de cien años, así como para la prevención de enfermedades. Numerosas cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* se han probado desde entonces empleando cultivos puros de células vivas, por su eficacia en el tracto digestivo. Los aditivos alimentarios se adicionan en cantidades trazas a las dietas y son usados habitualmente con tres fines fundamentales: mejorar el sabor u otras características de las materias primas y piensos, así como prevenir ciertas enfermedades. Dentro de las características que deben presentar los aditivos biológicos se enumeran los siguientes: alta concentración de microorganismos viables, estabilidad en condiciones ambientales normales

por un período no inferior a 30 días entre otras. Dichas características son de gran interés para seleccionar microorganismos para su uso probiótico. <sup>(9)</sup>

### **3.10.2 Criterios para la selección de cepas de uso probiótico.** <sup>(9)</sup>

Los criterios más importantes de selección que han sido empleados para escoger cepas de levadura con características probióticas se agrupan por sus propiedades de resistencia, funciones y potencialidades, resaltando dentro de estos:

Tolerancia a elevada acidez.

Resistencia a sales biliares.

Capacidad de colonización a células intestinales.

Efecto antagónico directo sobre enterobacterias y otras levaduras.

Efecto antisecretor contra las toxinas de microorganismos patógenos mediado por la producción de proteasas.

Inducción a pH inferior a 4.

Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas.

Producción de ácido láctico.

### **3.11 Mecanismos de acción de las levaduras probióticas.** <sup>(9)</sup>

El empleo de probióticos en el caso de las levaduras está dado por su capacidad de colonización, la cual se produce a través de diferentes mecanismos. Desde el punto de vista bioterapéutico, estos mecanismos pueden ser clasificados como farmacocinéticos (resistencia a acidez gástrica, proteólisis y capacidad de alcanzar alta densidad de población en el tracto gastrointestinal) y farmacodinámicos (antagonismo directo, efecto antisecretor y efecto trófico).

#### **3.11.1 Efecto antagónico de las enterobacterias y otras levaduras.** <sup>(9)</sup>

Se ha informado que la levadura no actúa destruyendo de forma directa a los microorganismos (bacterias, hongos, parásitos), sino que previene la unión de los microorganismos patógenos. Aumenta las proteínas protectoras y establece

una competencia con parásitos y levaduras del género *Cándida*. Otros autores, sin embargo, plantean que los efectos se deben a la reducción del crecimiento de microorganismos patógenos e inhibiendo las funciones celulares de algunos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolítica*, *Shigella flexneri* y *Vibrio cholerae*, por lo que *Saccharomyces boulardii* ha demostrado un efecto antagónico directo "in vivo" en ratones contra las cepas *Cándida albicans*, *Cándida krusei*, y *Cándida pseudotropicalis*; Esta levadura reduce el crecimiento de *Cándida albicans*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella enteritidis* y demuestra el efecto contra *Clostridium difficile*.

### **3.12 Mecanismos específicos de las levaduras que difieren de las bacterias probióticas.**<sup>(9)</sup>

Producción de proteasas: Las proteasas son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis total de proteínas, llamadas también peptidasas por hidrolizar enlaces peptídicos. Juegan un importante papel en todas las funciones orgánicas, son necesarias para el crecimiento y diferenciación celular, en procesos de recambio de proteínas, secreción de compuestos a través de las membranas celulares y la maduración de enzimas y hormonas, entre otras. También refieren que las proteasas producidas por levaduras generalmente son capaces de actuar en un amplio rango de valores de pH (4 a 11) y sobre una gran diversidad de sustratos, aunque son menos termo resistentes que las proteasas bacterianas.

Algunas levaduras segregan cantidades apreciables de proteasas, pero las del género *Saccharomyces* sólo tienen actividad de este tipo limitada. Se plantea que la levadura *Saccharomyces boulardii* en altas concentraciones tiene dos mecanismos de actividad antiseptora que actúan sobre las toxinas bacterianas. Esta levadura produce dos proteínas de diferentes pesos moleculares: 54 Kda y 120 Kda, respectivamente.

### 3.13 Estudios en la aplicación de levadura probiótica. <sup>(19)</sup>

En un estudio donde se evaluó la capacidad de *Saccharomyopsis schoenii*, como agente de control biológico contra hongos filamentosos fitopatógenos en naranjas, se obtuvo que *Saccharomyopsis schoenii* es capaz de reducir la severidad de la enfermedad en naranjas inoculadas con todos los hongos. La levadura pudo sobrevivir durante 21 días en la superficie de la fruta y no produjo lesiones en las naranjas. La levadura redujo la gravedad de la enfermedad contra *P. expansum* en un 61.0 %. La concentración de células de levadura necesaria para lograr el control de la enfermedad fue alta, como se demostró anteriormente para otras levaduras utilizadas en estudios de control biológico. *S. schoenii* produjo un control eficiente de los mohos cuando se inoculó a concentraciones de al menos  $10^8$  células/mL. Probablemente la depredación de los hongos es la forma preferencial por la cual *S. schoenii* obtiene compuestos sulfurados que son escasos en la superficie de las naranjas. La interacción de más de un evento antagónico, como la depredación, la competencia y otros antagonistas interacciona y a menudo se reporta. Como resultado, es posible que la acción de *S. schoenii* surja de más de una de estas interacciones, aunque es notable que la producción de sustancias antagonistas no se detectara en este estudio.

**CAPÍTULO IV**  
**METODOLOGÍA**

## 4.0 METODOLOGÍA

### 4.1 Metodología del estudio

#### 4.1.1 Estudio exploratorio.

La investigación realizada adquirió un enfoque de tipo exploratorio y experimental, ya que el método aplicado no había sido desarrollado previamente en otros trabajos de investigación; el propósito del ensayo, fue obtener resultados de la aplicación de la levadura probiótica (*Saccharomyces boulardii*  $10^8$  células de levadura/mL) para relacionarlos con la disminución de la concentración de ocratoxina A en granos de café oro y pergamino, así como, para comprobar las condiciones de almacenamiento en las etapas de beneficio y tostaduría en la aparición de hongos productores de ocratoxina A, para lo cual, se relacionaron la humedad relativa y la temperatura de almacenamiento.

#### 4.1.2 Estudio experimental.

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de la empresa AgroBiotek El Salvador, al igual que en el área de beneficio y tostaduría de una empresa exportadora de café; Se realizó un estudio de tipo experimental basado en la aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* a la concentración de  $10^8$  células de levadura/mL por 15 minutos, para cuantificar la disminución de la concentración de ocratoxina A en granos de café oro y pergamino. El estudio se realizó con muestras de café oro y muestras de café pergamino obtenidas de una empresa exportadora de café, las cuales se caracterizaron previamente con el uso de una ficha técnica que permitió recabar datos relacionados a las condiciones reales de almacenamiento de los granos de café. Se realizó el experimento con un diseño completamente al azar con arreglo factorial y con una repetición; Para el experimento, se aplicó la levadura probiótica (*Saccharomyces boulardii* a una

concentración de  $10^8$  células de levadura/mL por un tiempo de 15 minutos) a muestras de café oro y muestras de café pergamino, teniendo como controles, muestras de café oro y café pergamino, a las cuales no se les aplicó ningún tipo de tratamiento. Las muestras y controles de café pergamino y café oro, se resguardaron en condiciones de temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se extrajeron durante los días 0, 15, 56, 60 y 90; se realizaron las determinaciones correspondientes: porcentaje de humedad, recuento total de mohos y levaduras, identificación de hongos ocratoxigénicos y cuantificación de ocratoxina A.

#### **4.2 Caracterización de las condiciones de almacenamiento.**

Para la caracterización de los granos de café oro y pergamino, se utilizó la “Ficha técnica para caracterización de lotes de café” (Ver Anexo N° 1), la cual permitió recabar información acerca del proceso de cosecha, recolección y condiciones de almacenamiento de los granos de café.

De la ficha para la caracterización de las muestras se obtuvieron los datos siguientes:

- Descripción de las características de los granos de café.
- Variedad y origen.
- Procedencia o lugar de producción.
- Sistema de cultivo.
- Descripción del proceso de recolección.
- Descripción de las condiciones de almacenamiento reales.
- Humedad del grano.
- Humedad y temperatura del cuarto de almacenamiento.

#### **4.3 Universo y muestra.**

##### **4.3.1 Universo.**

Se consideró como universo para efectos de este estudio los granos de café pergamino y granos de café oro, provenientes de los cuartos de almacenamiento de beneficio y tostaduría respectivamente, obtenidos del beneficio de café Tuxpal, ubicado en San Juan Opico, La Libertad.

#### **4.3.2 Muestra.**

Se consideró como muestra a los granos de café oro y granos de café pergamino equivalentes a 1.0 Kg, previamente caracterizados con la “Ficha técnica para caracterización de lotes de café”

#### **4.3.3 Sitio de recolección de muestras.**

La recolección de las muestras se realizó en las áreas de almacenamiento de beneficio y de tostaduría de la empresa exportadora de café, ubicada en Carretera a Santa Ana, km 27 ½, Cantón las Delicias, San Juan Opico, La Libertad, El Salvador. (Ver Anexo N° 2).

#### **4.3.4 Muestreo y variables de medición.** <sup>(5, 8)</sup>

Antes del muestreo de los granos de café, se realizó la caracterización de los lotes, para lo cual se utilizó la metodología propuesta por *Franco H. et al* <sup>(5)</sup>, así como la ISO 4072:1982, la cual establece la metodología de muestreo para café verde en cantidades de 10 o más sacos. (Ver Anexo N° 3)

Para la toma de muestra se consideraron lotes representativos según lo siguiente:

- El número de sacos seleccionados de un lote con el propósito de toma de incrementos (La cantidad no menor de 1,500gr. de granos de café) el cual no ha sido menor de 10 sacos.
- De 10 a 100 sacos en el lote; y no menor al 10% del total.

- Los sacos muestreados se tomaron aleatoriamente de sacos individuales localizados en la misma estiba, utilizando un chuzo de acero inoxidable debidamente sanitizado y tomando tres puntos diferentes por cada saco muestreado.

Las muestras de granos de café recolectados se colocaron en bolsas plásticas estériles con cierre hermético grado alimenticio; las muestras se rotularon con sus respectivas etiquetas de identificación (Ver Anexo N° 4); asimismo, para cada lote recolectado se tomó la información detallada en la ficha técnica, según se especifica en el Anexo N° 5.

En relación con la cantidad de sacos muestreados se consideró, la cantidad de lotes existentes en cada cuarto de almacenamiento al momento que se realizó la toma de muestras. Para ello, se tomó en cuenta lo siguiente:

**Tabla No. 1** Número de muestras recolectadas de acuerdo con el tamaño de lote. <sup>(5, 7,8)</sup>

Tamaño de lote	Número de muestras a tomar (Kg)
Hasta 50 Kg	Mínimo 3 muestras
De 51 a 500Kg	5 muestras

El detalle de las muestras recolectadas se ha especificado en el Anexo N° 6, en el cual se describe la distribución de las muestras para los análisis realizados, habiendo recolectado un total de 20 muestras, de las cuales 10 muestras se consideraron para la aplicación de la levadura probiótica y 10 muestras restantes se utilizaron como controles, lo anterior se resume a continuación:

**Tabla No. 2** Cantidad de muestras recolectadas.

<b>Muestra (Área de obtención)</b>	<b>Cantidad de muestra</b>	<b>N° de muestras para aplicación de levadura probiótica</b>	<b>N° de muestras controles</b>	<b>Total de muestras por área</b>
Café Pergamino (Almacenamiento de beneficio)	30 gramos por muestra	5 muestras	5 muestras	10 muestras
Café Oro (Almacenamiento de tostaduría)	30 gramos por muestra	5 muestras	5 muestras	10 muestras
<b>Total muestras por análisis</b>		10 muestras	10 muestras	20 muestras

Las muestras recolectadas se utilizaron para la verificación de las variables de medición como: porcentaje de humedad, recuento total de mohos y levaduras, identificación de hongos productores de ocratoxina y cuantificación de Ocratoxina A, mediante la prueba para determinación de ocratoxina A AgraQuant® ELISA.

Las muestras recolectadas de café oro y café pergamino (obtenidas del área de almacenamiento de beneficio), se utilizaron para ser analizadas en los tiempos definidos 0, 15, 56, 60 y 90 días de análisis (Ver Tabla N° 3); el primer análisis se realizó en el día cero después de la aplicación de la levadura probiótica; el segundo análisis en el día quince, el tercero en el día cincuenta y seis, el cuarto análisis en el día sesenta y el quinto análisis en el día noventa. En la tabla siguiente se resumen los tiempos de análisis con sus respectivas determinaciones a realizar.

**Tabla No. 3** Variables de medición según los tiempos de análisis.

Tratamiento aplicado	Tipo de muestra	Tiempo de análisis	Variables de medición por cada día de análisis
Levadura Probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> .	Café Pergamino (Área de almacenamiento de Beneficio). Café Oro (Área de almacenamiento de Tostaduría).	0 días	-Porcentaje de Humedad. -Recuento total de mohos y levaduras. -Identificación de hongos productores de ocratoxina A. -Cuantificación de ocratoxina A.
		15 días	
		56 días	
		60 días	
		90 días	
Muestras testigos.	Café Pergamino (Área de almacenamiento de Beneficio). Café Oro (Área de almacenamiento de Tostaduría).	0 días	
		15 días	
		56 días	
		60 días	
		90 días	

#### 4.3.5 Traslado de muestras al laboratorio de análisis microbiológico.

El traslado de muestras al laboratorio se realizó en contenedores tipo hieleras, debidamente limpios y sanitizados, para evitar cualquier tipo de contaminación. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de la empresa AgroBioTek El Salvador, para realizarles los respectivos análisis y determinaciones según los días correspondientes (0, 15, 56, 60 y 90 días).

#### 4.3.6 Almacenamiento de las muestras y testigos.

Las condiciones de almacenamiento para las muestras y los testigos fueron a condiciones de temperatura ambiente, lo anterior, para asemejar las condiciones reales donde se resguardan los granos en los beneficios de café.

Para los análisis realizados en los días correspondientes, cada muestra fue extraída del cuarto de almacenamiento donde se encontraron almacenadas para su respectivo análisis; para el caso de la muestra analizada en el día cero, se aclara, que no fue almacenada, sino que el análisis se realizó el mismo día de la recolección de las muestras y al mismo tiempo se aplicó la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*. Cabe resaltar que para el caso de las muestras testigos, no se les aplicó ningún tipo de tratamiento (levadura probiótica), sin embargo, fueron sometidas a las mismas condiciones que el resto de las muestras del estudio.

#### 4.4. Diseño del experimento.

Se realizó el experimento con un diseño completamente al azar con arreglo factorial y con una repetición (aplicación de la levadura probiótica), en la Tabla N°4 se desglosa el detalle.

**Tabla No. 4** Descripción de los tratamientos aplicados al café oro y pergamino.

Tratamiento	Tratamientos	Tiempo (días)	Descripción
Tratamiento No. 1	Café oro + <i>Saccharomyces boulardii</i>	0	Tratamiento 1 en el día 0
		15	Tratamiento 1 en el día 15
		56	Tratamiento 1 en el día 56
		60	Tratamiento 1 en el día 60
		90	Tratamiento 1 en el día 90
Tratamiento No. 2	Café pergamino + <i>Saccharomyces boulardii</i>	0	Tratamiento 2 en el día 0
		15	Tratamiento 2 en el día 15
		56	Tratamiento 2 en el día 56
		60	Tratamiento 2 en el día 60
		90	Tratamiento 2 en el día 90
Testigos	<b>Testigo N° 1</b> (Café oro)	0	Testigo 1 en el día 0
		15	Testigo 1 en el día 15
		56	Testigo 1 en el día 56
		60	Testigo 1 en el día 60

Tratamiento	Tratamientos	Tiempo (días)	Descripción
		90	Testigo 1 en el día 90
	<b>Testigo N° 2</b> (Café pergamino)	0	Testigo 2 en el día 0
		15	Testigo 2 en el día 15
		56	Testigo 2 en el día 56
		60	Testigo 2 en el día 60
		90	Testigo 2 en el día 90

#### 4.4.1 Reconstitución de la levadura probiótica.

La reconstitución de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, se realizó a partir de la levadura de tipo comercial (Ver Anexo N° 7), para lo cual se procedió según el detalle siguiente:

- A partir del polvo liofilizado de *Saccharomyces boulardii*, equivalente a  $10^{10}$  células de levadura.
- Se pesó la cantidad de 2.0 g de polvo liofilizado y se reconstituyo con la adición de 100 mL de agua estéril a temperatura ambiente.
- El líquido reconstituido se homogenizó suavemente con la ayuda de un agitador magnético a 100rpm por 5 min.
- Se dejó reposar durante 20 minutos, a temperatura de 25 –30°C.
- Posteriormente se homogenizó nuevamente a temperatura ambiente durante 5 min.
- Se extrajo en forma estéril con la ayuda de una pipeta y se procedió a la estandarización de esta.

#### 4.4.2 Estandarización de la levadura probiótica.

La estandarización de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, se realizó utilizando el método espectrofotométrico a una longitud de onda de 620

nm (Ver Anexo N° 8) y según la metodología descrita por *Pardo, et al.* <sup>(18)</sup> y por *Solís L. Napa California y Melo, et al.* <sup>(11, 25)</sup>; tal como se describe a continuación:

- Se extrajo 1.0 mL del líquido reconstituido de *Saccharomyces boulardii* equivalente a  $10^9$  células de levadura/ml.
- Se colocó 1.0 mL de solución reconstituida de *Saccharomyces boulardii* en un tubo de ensayo que contenía 10mL de solución salina estéril y posteriormente se procedió a agitarlo hasta obtener una solución homogénea.
- Se adicionó 1000  $\mu$ L de solución homogénea de *Saccharomyces boulardii* a una celda de cuarzo para realizar la lectura en el espectrofotómetro.
- Se efectuó la lectura en el espectrofotómetro ultravioleta visible a una longitud de onda de 620 nm.
- Se realizaron diluciones para obtener la concentración de  $10^8$  células de levadura/mL, considerando que la absorbancia entre 0.3-0.4 es equivalente a  $0.8 \times 10^8$ - $1.5 \times 10^8$  células de levadura/mL.

De la levadura estandarizada se tomó una alícuota de 1.0mL y se procedió a inocular en placas de Petri a las cuales se les adicionó agar Sabouraud (4% de glucosa) para el mantenimiento de las cepas.

#### **4.4.3 Aplicación de levadura probiótica a granos de café oro y café pergamino.** <sup>(11, 18, 25)</sup>

La aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* se realizó a una concentración de  $10^8$  células de levadura/mL <sup>(18, 25)</sup>, a muestras de café pergamino y a muestras de café oro.

La aplicación de la *Saccharomyces boulardii*, se realizó después de haber efectuado la estandarización de la levadura probiótica a la concentración de  $10^8$  células de levadura/mL <sup>(18, 25)</sup>, aplicando la levadura directamente a los granos de café oro y pergamino, mediante el método de sumergimiento durante 15

minutos, en condiciones de temperatura ambiente (Ver Anexo N° 9), según el detalle siguiente:

- Se pesó una muestra de granos de café oro/café pergamino equivalente a 30g.
- Se adicionó 10mL de levadura probiótica ( $10^8$  células de levadura/mL) a los 30 g de café oro/café pergamino los cuales se sumergieron en 1000 mL de agua purificada.
- Se procedió a medir el tiempo utilizando un cronometro digital (Se contó el tiempo de sumergimiento de los granos de café: 15 minutos).
- Se retiraron los granos de café oro/café pergamino y se procedió a extenderlos sobre bandejas de secado, debidamente sanitizadas, el proceso de secado se realizó a condiciones de temperatura ambiente.

El experimento se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de la empresa AgroBioTek El Salvador y la recolección del café en el beneficio de una Empresa Exportadora de Café, en el periodo de septiembre de 2019 a noviembre de 2020.

#### **4.4.4. Secado de los granos de café oro y café pergamino**

Una vez que se aplicó la levadura probiótica a los granos de café oro y café pergamino, se efectuó el proceso de secado de los granos de café, los cuales se dejaron secar al ambiente en bandejas de secado, entre 1 y 2 días, verificando constantemente la humedad relativa de los granos de café, hasta obtener un porcentaje del 12%; luego las muestras se resguardaron en bolsas plásticas estériles, a condiciones de temperatura ambiente, para posteriormente efectuar las determinaciones pertinentes en los días correspondientes a los análisis: 15, 56, 60 y 90 días.

#### **4.5 Variables de Medición en los días de análisis**

#### 4.5.1 Determinación del porcentaje de humedad

La determinación del porcentaje de humedad en granos de café oro y granos de café pergamino, se realizó utilizando una balanza de humedad Ohaus MB45 (Ver Anexo N° 10), según como se especifica a continuación:

- Se pesó una muestra de granos de café oro/café pergamino, equivalente a 10 g.
- Se realizó el proceso de encendido de la balanza de humedad con el botón de encendido/apagado, se esperó un tiempo aproximado de 10 minutos para su estabilización.
- Se verificó que el peso de la balanza de humedad se encuentre a cero, para iniciar la medición.
- Se programaron los parámetros de la medición y el perfil del secado especificando la temperatura de secado a 100°C por 10 minutos y colocando los resultados en % de humedad.
- Se colocó la muestra en el platillo para realizar la determinación de la humedad del grano de café oro/granos de café pergamino.
- Se procedió a anotar los resultados para cada día de análisis. (0, 15, 56, 60 y 90 días)

#### 4.5.2 Identificación de hongos productores de ocratoxina A, en granos de café oro y café pergamino. <sup>(13)</sup>

Para la identificación de los hongos productores de ocratoxina A, previamente se realizó, la cuantificación de hongos, mediante la metodología planteada por *Camacho, et al.* <sup>(2)</sup>, posteriormente, de las placas que presentaron crecimiento de hongos se tomó una muestra y se procedió a realizar la identificación de los hongos mediante el uso del microscopio, para verificar la existencia de hongos productores de ocratoxina.

#### **4.5.2.1 Cuantificación de hongos productores de ocratoxina A en muestras de café oro y café pergamino.**

Para la cuantificación de hongos productores de ocratoxina en granos de café oro y granos de café pergamino, se realizó de la forma siguiente:

- Se pesó en una balanza semianalítica una muestra de 10 g de café oro o de café pergamino.
- Se procedió a estomachear 10.0 g de muestra de café oro o de café pergamino a 260 rpm por 1 minuto, con 90.0 mL de agua peptonada estéril, con esto se obtuvo la dilución  $10^{-1}$ .
- Posteriormente se realizaron diluciones seriadas con agua peptonada 1:10 hasta obtener la dilución  $10^{-4}$ .
- Se inoculó por duplicado 1.0 mL de las diluciones preparadas en placas de Petri.
- Se adicionó aproximadamente 15 - 20 mL de Agar Papa Dextrosa (PDA) previamente preparado a las placas de Petri. (Ver Anexo N° 11)
- Se homogenizaron las placas de Petri: muestra más medio de cultivo, mediante la técnica en ocho.
- Las placas de Petri se incubaron durante 3 a 5 días a temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Después de los días de incubación, se realizó el recuento de las placas con presencia de colonias de hongos, se estimó el promedio de UFC/g por muestra de café oro y muestra de café pergamino.

De las placas que presentaron crecimiento de hongos, se realizó la identificación de los hongos, mediante el uso del microscopio.

La cuantificación de hongos productores de ocratoxina en granos de café oro y en granos de café pergamino se realizó para cada día de análisis 0, 15, 56, 60 y 90 días. (Ver Anexo N° 12)

#### **4.5.2.2 Identificación de hongos productores de ocratoxina mediante el uso de microscopio.**

La identificación de hongos productores de ocratoxina tales como *Penicillium sp* y *Aspergillus sp*, se realizó mediante la tinción al fresco, de la siguiente manera:

- Se seleccionaron las placas de Petri que mostraron crecimiento de hongos.
- Se colocó una muestra de crecimiento de las placas de Petri con un asa de platino estéril en una lámina porta muestra a la que previamente se le colocó una gota de solución salina estéril.
- Se realizó la distribución de la muestra de hongos en la solución salina, de manera que se homogenizara adecuadamente en la lámina portaobjeto.
- Se colocó una lámina cubre objeto y se observó al microscopio 40x y 100x (Ver Anexo N° 13)
- Se identificó la morfología de las colonias, así como, la existencia de micelio, conidio, conidióforo e hifas, los cuales presentaron similitud con las imágenes del Anexo N° 14.

#### **4.5.3 Cuantificación de la presencia de Ocratoxina A en granos de café oro y café pergamino.**

La cuantificación de la ocratoxina A en las muestras de café oro/café pergamino, se realizó mediante la prueba para la determinación de ocratoxina A AgraQuant® ELISA, según el detalle siguiente:

- Se prepararon las muestras de análisis mediante el molido de los granos de café oro/café pergamino con un molino de cuchillas hasta la obtención de un polvo fino.
- Se procedió al tamizaje de las muestras utilizando un tamiz de 20 micras.

- Se procedió a pesar una cantidad equivalente a 20 g de polvo de muestra tamizado.
- A las muestras pesadas se les adicionó 30mL de metanol al 70 y se procedió a agitar vigorosamente por 3 minutos.
- Las muestras fueron filtradas para obtener una solución líquida y transparente a la cual se le realizó la medición del pH, verificando que se encontrara entre 6-8.
- Se prepararon los reactivos y el equipo de lectura Stat Fax 4700 ELISA Reader.
- A continuación, se pipetearon 200µL de solución conjugada y se colocaron dentro de los pocillos de dilución.
- Se adicionaron a los micropocillos, 100µL de la solución previamente preparada de las muestras de granos de café oro/café pergamino y muestras testigos.
- Homogenizar la mezcla depositada en los pocillos de dilución utilizando un micropipeteador y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se realizaron 5 lavados de los pocillos de dilución utilizando agua destilada y posteriormente, se procedió al secado de los pocillos con papel absorbente.
- Se adicionó 100µL de solución sustrato y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se adicionó 100µL de solución Stop para detener la reacción de extracción de las muestras.
- Se procedió a realizar la lectura de las muestras utilizando el lector de micropocillos con filtro de 450 nm y filtro diferencial de 630 nm (Stat Fax 4700 ELISA Reader). (Ver Anexo N° 15)

Especificación de ocratoxina: el valor de ocratoxinas recomendada se encuentra en 4 µg/kg. Según el valor establecido por la Unión Europea los

límites máximos admisibles para la ocratoxina A es de 5 ppb en el café tostado y molido, y 10 ppb en el café instantáneo. (4, 21)

#### **4.6 Determinación de las características organolépticas del producto final.**

Las características organolépticas serían evaluadas mediante la catación de los granos de café como producto terminado, mediante la degustación por parte de catadores certificados de la Asociación Salvadoreña de Catadores de Café, para realizar este proceso el protocolo establecido en el Anexo N° 16, establece tostar una muestra equivalente a 25 gramos de café, tanto café en grano oro como del que se encontró en grano pergamino, según el detalle siguiente:

Café oro con aplicación de levadura probiótica (Muestra A)

Café pergamino con aplicación de la levadura probiótica (Muestra B)

Café oro con sin aplicación de levadura probiótica (Testigo A)

Café pergamino sin aplicación de la levadura probiótica (Testigo B)

Para el caso del café pergamino antes del proceso de tostado se retira la cascara y una vez tostados los granos se realiza el enfriamiento de los mismos a temperatura ambiente en pequeñas bandejas y proceder a pesar una cantidad equivalente a 8.25 gramos, para cada taza de café a preparar y posteriormente proceder con el molido de los granos hasta obtener un molido fino y homogéneo, para posteriormente realizar la preparación de la bebida, utilizando una cafetera de tipo prensa francesa y agua filtrada a temperatura de 100°C. Preparando 3 tazas para cada una de las muestras y para cada uno de los testigos, obteniendo un total de 12 tazas.

Se procede al enmascaramiento de las tazas de café, con el objeto de que la evaluación de las muestras y testigos no este sesgada por el catador, y obtener resultados reales, por lo que la identificación de las muestras y testigo únicamente puede ser conocida por parte de las investigadoras.

Posteriormente se evalúa por parte del catador las características de las bebidas, en un tiempo significativo de aproximadamente 10 a 15 minutos, de

modo que las bebidas se encontraran a una temperatura óptima para su degustación aproximadamente a 70°C, procediendo a la evaluación de los siguientes parámetros:

- Aroma
- Sabor
- Acidez
- Cuerpo de la bebida

En relación con el dulzor y la uniformidad de la bebida se evalúa una vez que el producto alcance una temperatura de 25°C.

#### **4.7 Análisis costo-efectividad.**

Se realizó el análisis de costo-efectividad del método de protección aplicado (levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*), para determinar la factibilidad en relación con el uso de los métodos convencionales, lo cual sirvió para llegar a determinar si el método estudiado es más efectivo en la reducción de la ocratoxina A y si es menos costoso en su implementación. En este análisis se realizó una evaluación económica del método de protección aplicado a los granos de café oro y pergamino, se compararon sistemáticamente los costos relativos y los efectos de las diferentes intervenciones en los granos de café oro y granos de café pergamino en relación con la disminución de la ocratoxina A. La aplicación del análisis costo-efectividad permitió medir, valorar y comparar los costos y los beneficios del método aplicado en los dos tipos de granos de café, lo que permitió establecer que los beneficios generados hacen que valga la pena invertir para su implementación.

#### **4.8 Variables de medición y análisis estadístico.**

##### **4.8.1 Variables respuestas.** <sup>(2)</sup>

-Porcentaje de humedad en las unidades experimentales.

- Recuento de Unidades Formadora de Colonias (UFC/g).
- Identificación de hongos productores de OTA.
- Cuantificación de los niveles de ocratoxinas en ppb.

#### **4.9 Análisis estadístico.**

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), lo cual permitió comparar las medias de los resultados de las muestras evaluadas en la aplicación de la levadura probiótica, en relación con la variable de interés (diminución de la concentración de ocratoxina A), lo anterior para determinar si existe o no diferencia significativa entre las medias.

**CAPÍTULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## **5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

A continuación, se presentan los resultados de los datos, luego de la aplicación de la levadura probiótica (*Saccharomyces boulardii*) en los granos de café oro y café pergamino, así como, los resultados obtenidos de las variables de medición durante los días de análisis 0, 15, 56, 60 y 90 días. Las mediciones correspondientes a los días 30 y 45 no fueron efectuadas, como inicialmente se habían planteado, sin embargo, el día 56, se consideró como el tiempo que reemplaza a los tiempos 30 y 45 planteados inicialmente. Cabe mencionar que para el recuento de ocratoxina los tiempos utilizados para las determinaciones son correspondientes a 0, 15 y 90 días.

### **5.1 Caracterización de las condiciones de almacenamiento y los granos de café oro y pergamino.**

El proceso de caracterización de las condiciones de almacenamiento y de los granos de café oro y café pergamino, se realizó mediante la aplicación de la ficha técnica detallada en el Anexo N° 1, en la cual, se detallaron las condiciones de almacenamiento a las cuales se han encontrado almacenados los granos de café oro y pergamino, previo a la toma de muestra, lo anterior, se realizó con el objeto de obtener un historial y registro de las condiciones de almacenamiento a las cuales se encontraban almacenados los granos de café e identificar si éstas condiciones afectaban la aparición de hongos productores de ocratoxina. Por otra parte, se realizó la caracterización de los granos de café oro y pergamino, mediante la verificación de los aspectos críticos que pueden variar entre lote y lote.

De los aspectos más relevantes verificados en el proceso de caracterización, se pueden mencionar los siguientes:

- Temperatura en el día de muestreo

- Humedad relativa
- Circulación del aire entre el techo y la pared → parámetro cualitativo: posee / no posee
- Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados) → parámetro cualitativo: posee / no posee
- Cantidad de sacos apiñados por lote → (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)
- Control de roedores → (Existencia de trampas: si/no)

**Cuadro No. 1** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 1.

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 1</b>	
No. De Lote:	Lote 01
Tipo de grano:	Café pergamino
Descripción física del grano:	Semillas de color café oscuro con una pequeña cubierta tipo cascarilla rugosa al tacto. Olor ligeramente característico a café. El tamaño promedio de las semillas es de aproximadamente 0.4 milímetros.
Variedad:	Cereza corriente variedad bourbon
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (variedad cereza)
Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del departamento de La Libertad, El Salvador.
Sistema de cultivo: <i>(cafetales a libre exposición)</i>	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.
Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en las condiciones adecuadas.

Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: ( <i>manual, mecánica, óptica</i> )	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	11.5%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34°C
Humedad relativa del ambiente	54%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados)	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	5 sacos
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No

Muestra del grano de café recolectado:



**Cuadro No. 2** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 2.

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 2</b>	
No. De Lote:	Lote 02
Tipo de grano:	Café pergamino
Descripción física del grano:	Mezcla de semillas de color café oscuro y semillas de color café claro, ligeramente rugosas al tacto y con olor característico a café. El tamaño de las semillas es se observa variado entre 0.3 y 0.4 milímetros.
Variedad:	Pergamino verde variedad Bourbon
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (Pergamino verde Bourbon)
Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del departamento de La Libertad, El Salvador.
Sistema de cultivo: ( <i>cafetales a libre exposición</i> )	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.
Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en

	las condiciones adecuadas.
Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: ( <i>manual, mecánica, óptica</i> )	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	11.5%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34.3°C
Humedad relativa del ambiente	53%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados)	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	5 sacos
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No

Muestra del grano de café recolectado:



**Cuadro No. 3** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 3.

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 3</b>	
No. De Lote:	Lote 03
Tipo de grano:	Café pergamino
Descripción física del grano:	Mezcla de semillas de color café oscuro y semillas de color café claro, ligeramente rugosas al tacto y con olor dulzón característico a café. El tamaño de las semillas es se observa variado entre 0.3 y 0.4 milímetros.
Variedad:	Pergamino de primera variedad Borbón (calidad HG-G)
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (Pergamino de primera variedad Borbón)
Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del departamento de La Libertad, El Salvador.
Sistema de cultivo: ( <i>cafetales a libre exposición</i> )	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.

Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en las condiciones adecuadas.
Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: ( <i>manual, mecánica, óptica</i> )	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	11.5%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34.°C
Humedad relativa del ambiente	54%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados)	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	5 sacos
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si

	<input type="checkbox"/> No
Muestra del grano de café recolectado:	
	

**Cuadro No. 4** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 4.

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 4</b>	
No. De Lote:	Lote 04
Tipo de grano:	Café pergamino
Descripción física del grano:	Semillas de color café oscuro con una pequeña cubierta tipo cascarilla rugosa al tacto, el color de los granos se identifica que varía verificando granos que se encuentran más oscuros que otros. El tamaño promedio de las semillas es de aproximadamente 0.4 milímetros.
Variedad:	Cereza flote variedad Bourbon (Calidad HG-G)
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (Café Pergamino variedad Bourbon)
Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del departamento de La Libertad, El

	Salvador.
Sistema de cultivo: <i>(cafetales a libre exposición)</i>	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.
Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en las condiciones adecuadas.
Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: <i>(manual, mecánica, óptica)</i>	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	12.0%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34.°C
Humedad relativa del ambiente	54%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados)	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de	5 sacos

sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Muestra del grano de café recolectado:	
	

**Cuadro No. 5** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 5.

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 5</b>	
No. De Lote:	Lote 05
Tipo de grano:	Café pergamino
Descripción física del grano:	Semillas de color café claro de color uniforme y con superficie ligeramente liso al tacto. Olor dulzón y característico a café. El tamaño promedio de las semillas es de aproximadamente entre 0.3 y 0.4 milímetros.
Variedad:	Café Pergamino de primera Cuscatleco (Calidad SHG-G)
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (Café Pergamino cuscatleco.)
Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del

	departamento de La Libertad, El Salvador.
Sistema de cultivo: <i>(cafetales a libre exposición)</i>	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.
Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en las condiciones adecuadas.
Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: <i>(manual, mecánica, óptica)</i>	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	11.5%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34.°C
Humedad relativa del ambiente	54%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados)	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee

Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	5 sacos
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Muestra del grano de café recolectado:	
	

**Cuadro No. 6** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 6.

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 6</b>	
No. De Lote:	Lote 06
Tipo de grano:	Café oro
Descripción física del grano:	Semillas de color beige claro de color uniforme y con superficie ligeramente liso al tacto. Olor característico a café. El tamaño promedio de las semillas es de aproximadamente entre 0.3 milímetros.
Variedad:	Café oro Clase "A/A" Mezcla
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (Café oro Clase "A/A" Mezcla)
Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del

	departamento de La Libertad, El Salvador.
Sistema de cultivo: <i>(cafetales a libre exposición)</i>	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.
Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en las condiciones adecuadas.
Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: <i>(manual, mecánica, óptica)</i>	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	11.1%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34.5°C
Humedad relativa del ambiente	53%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados)	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee

Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	5 sacos
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Muestra del grano de café recolectado:	
	

**Cuadro No. 7** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 7.

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 7</b>	
No. De Lote:	Lote 07
Tipo de grano:	Café oro
Descripción física del grano:	Semillas de color beige claro de color uniforme y con superficie ligeramente liso al tacto. Olor característico a café. El tamaño promedio de las semillas es de aproximadamente entre 0.3 milímetros.
Variedad:	Café oro Selección gourmet mezcla.
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (Selección gourmet Mezcla)

Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del departamento de La Libertad, El Salvador.
Sistema de cultivo: <i>(cafetales a libre exposición)</i>	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.
Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en las condiciones adecuadas.
Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: <i>(manual, mecánica, óptica)</i>	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	12.0%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34.4°C
Humedad relativa del ambiente	55%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a	<input checked="" type="checkbox"/> Posee

las cantidades de sacos apiñados)	<input type="checkbox"/> No posee
Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	5 sacos
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Muestra del grano de café recolectado:	
	

**Cuadro No. 8** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 8

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 8</b>	
No. De Lote:	Lote 08
Tipo de grano:	Café oro
Descripción física del grano:	Semillas de color beige claro de color uniforme y con superficie ligeramente liso al tacto. Olor característico a café. El tamaño promedio de las semillas es de aproximadamente entre 0.3 milímetros.
Variedad:	Café oro Blend Mezcla
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (Blend Mezcla)
Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del

	departamento de La Libertad, El Salvador.
Sistema de cultivo: <i>(cafetales a libre exposición)</i>	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.
Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en las condiciones adecuadas.
Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: <i>(manual, mecánica, óptica)</i>	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	11.2%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34.3°C
Humedad relativa del ambiente	54%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados)	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee

Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	5 sacos
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Muestra del grano de café recolectado:	
	

**Cuadro No. 9** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 9

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 9</b>	
No. De Lote:	Lote 09
Tipo de grano:	Café oro
Descripción física del grano:	Semillas de color beige claro de color uniforme y con superficie ligeramente liso al tacto. Olor característico a café. El tamaño promedio de las semillas es de aproximadamente entre 0.3 milímetros.
Variedad:	Café oro Clase c (inferior) Mezcla
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (Clase C Mezcla.)
Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del departamento de La Libertad, El

	Salvador.
Sistema de cultivo: <i>(cafetales a libre exposición)</i>	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.
Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en las condiciones adecuadas.
Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: <i>(manual, mecánica, óptica)</i>	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	12.0%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34.3°C
Humedad relativa del ambiente	56%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados)	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de	5 sacos

sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Muestra del grano de café recolectado:	
	

**Cuadro No. 10** Resultados de la caracterización de los granos de café para el lote número 10

<b>Resultados del proceso de caracterización para el lote No. 10</b>	
No. De Lote:	Lote 10
Tipo de grano:	Café oro
Descripción física del grano:	Semillas de color beige claro de color uniforme y con superficie ligeramente liso al tacto. Olor característico a café. El tamaño promedio de las semillas es de aproximadamente entre 0.3 milímetros.
Variedad:	Café oro Clase B Mezcla
Origen geográfico:	El Salvador
Origen botánico:	Coffee arábica (Clase B Mezcla)
Procedencia o lugar de producción:	Producido en la zona cafetera del departamento de La Libertad, El Salvador.

Sistema de cultivo: <i>(cafetales a libre exposición)</i>	Cafetales a exposición libre
Fechas de producción:	Marzo a noviembre de 2019.
Vida Útil del grano de café.	Hasta 12 meses almacenado en las condiciones adecuadas.
Descripción del proceso de recolección:	Proceso de recolección del grano de forma manual
Descripción del proceso de clasificación: <i>(manual, mecánica, óptica)</i>	Manual
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	Bodega de almacenamiento en la cual se identifican tarimas de madera, donde se colocan los sacos de café apilados de 5 en 5 sacos. Se identifica espacio de circulación de aire entre en piso y los primeros sacos de café apilados. Se puede visualizar que entre el techo y la última estiba se tiene un espacio prudencial. No se identifica espacio entre cada una de las columnas de sacos apilados.
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	11.0%
Defectos identificados del grano de café:	No identificados
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	No identificados
Temperatura en el día de muestreo	34.4°C
Humedad relativa del ambiente	56%
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a las cantidades de sacos apiñados)	<input checked="" type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de	5 sacos

muestra)	
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input checked="" type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Muestra del grano de café recolectado:	
	

Como resumen de los cuadros anteriores se puede determinar que la bodega de almacenamiento cumple con las recomendaciones emitidas por diferentes asociaciones cafetaleras para el almacenamiento adecuado del café, entre las cuales se pueden mencionar:

- Tarimas separadas del suelo de las “piñas” o sacos de café apilados unos sobre otros, por lo cual existe el espacio de circulación de aire entre el piso y los primeros sacos de café.
- Cada “piña” consta no más de 5 sacos al momento del muestreo.
- Se visualizó que entre el techo y la última estiba existe un espacio prudencial, permitiendo la circulación de aire entre las estibas.
- Existe circulación de aire entre el techo y la pared, y contiene una malla metálica que impide el paso libre de roedores, murciélagos, entre otros a la bodega.
- El porcentaje de humedad del grano al momento del muestreo fue igual al del momento de almacenamiento: 11.5% promedio, esto cumple con la recomendación emitida por las asociaciones cafetaleras de secar el grano entre 11 a 12% para evitar crecimiento de hongos durante el almacenamiento.

- Se visualizaron trampas para roedores dentro y fuera de la bodega, como requisito de salubridad por parte de entidades gubernamentales y por certificaciones internacionales.
- Existe una recubierta plástica en todo el piso de la bodega ya que la zona es propensa a inundaciones en época lluviosa

Por otra parte en cuanto a la caracterización de los granos de café fue posible obtener información relacionada a los 10 lotes evaluados y utilizados para las diferentes determinaciones, asimismo, es importante resaltar que los diferentes tipos de granos de café a pesar de haber sido producidos en la misma zona cafetalera del departamento de La Libertad, El Salvador y bajo un mismo sistema de cultivo al aire libre, presentan características variables en particular en cuanto al % de humedad del grano de café determinada al momento de la verificación *in situ* identificando que para el café pergamino oscila entre 11.5% a 12.0%, asimismo, en relación a la temperatura de almacenamiento se identificó que oscila entre 34°C y 34.3°C; para el caso de la humedad relativa del ambiente esta se encontró entre 53 y 54% para el café pergamino. Además, con relación a las muestras de café oro se identificaron variaciones en cuanto a la humedad del grano oscilando entre 11% a 12%; en cuanto a la temperatura de almacenamiento durante el día de recolección de las muestras las variaciones oscilaron entre 34.3°C a 34.5°C, así como, el porcentaje de humedad relativa del cuarto de almacenamiento donde fueron recolectados los granos de café la cual se encontró dentro de los parámetros de 53% a 56%, a continuación se resumen las variaciones identificadas en el proceso de caracterización de los granos de café.

**Cuadro No. 11** Variaciones identificadas en la caracterización de los granos de café oro y café pergamino.

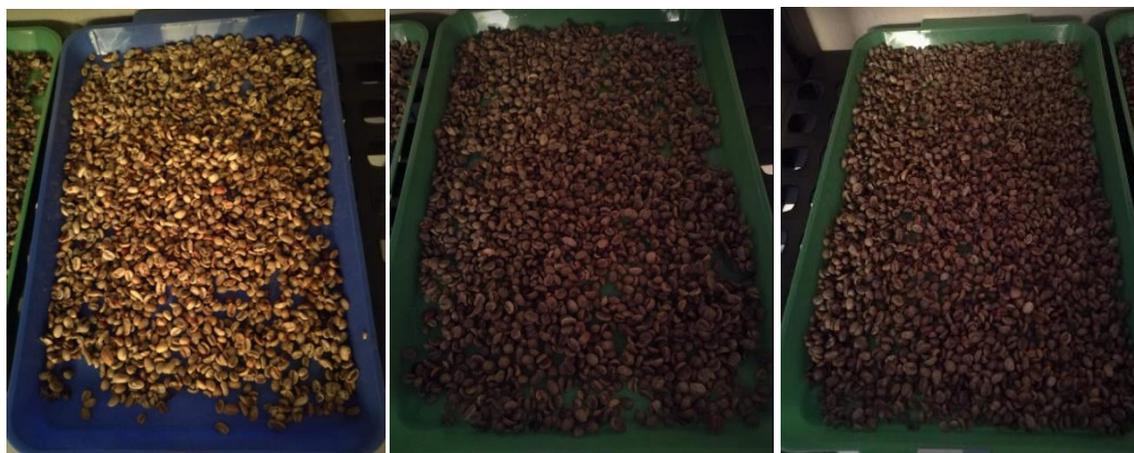
Criterio	Lote 01	Lote 02	Lote 03	Lote 04	Lote 05	Lote 06	Lote 07	Lote 08	Lote 09	Lote 10
Humedad del grano	11.5 %	11.5 %	11.5 %	12.0 %	11.5 %	11.1 %	12.0 %	11.2 %	12.0 %	11.0 %
Temperatura de almacenamiento	34°C	34.3° C	34.° C	34.° C	34.° C	34.5° C	34.4° C	34.3° C	34.3° C	34.4° C
%HR del ambiente	54%	53%	54%	54%	54%	53%	55%	54%	56%	56%
Tipo de café*	P	P	P	P	P	O	O	O	O	O

\*P= Pergamino; O= Oro

## 5.2 Resultados de la aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*

La aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* se realizó, mediante el método sumergimiento de los granos de café a la concentración de 108 células de levadura/mL durante 15 minutos, lo cual permitió identificar que los granos de café oro y café pergamino mantuvieron sus características iniciales después de haber pasado por el proceso de secado, ya que a pesar, que la aplicación ha sido por vía húmeda, no se identificaron modificaciones de las características físicas de los granos de café oro y granos de café pergamino después de la fase de secado.

Por otra parte, en cuanto al proceso de secado de los granos de café pergamino el cual se realizó a condiciones de temperatura ambiente, permitió identificar que los granos de café pergamino presentaron un porcentaje de humedad promedio de 11.6%; determinando dicho dato como el promedio del porcentaje de humedad inicial de los granos de café pergamino tratados con levadura probiótica, mientras que para las muestras de café oro tratadas con levadura probiótica se obtuvo un porcentaje de humedad promedio de 11.46%.



**Figura No. 4** Granos de café en bandejas de secado después de la aplicación de la levadura probiótica.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos de las mediciones del porcentaje de humedad al inicio y final de la investigación, lo cual se determinó para los granos de café oro y granos de café pergamino, tanto para las muestras tratadas con la levadura probiótica como para las muestras testigos.

**Cuadro No. 12** Resultados de la medición de humedad en granos de café pergamino, al inicio y final de la investigación.

Resultados de la medición de humedad para muestras de café pergamino.	
%Humedad inicial (día cero)	% Humedad final (día 90)

Lote	Tratadas	Testigos	Tratadas	Testigos
1	11.5	12	17.9	18.8
2	11.5	12	12.3	12.3
3	11.5	12.3	12.5	12.3
4	12	12	10.2	13
5	11.5	12	13.4	14.5
<b>Promedio</b>	11.6	12.06	13.26	14.18

En el cuadro anterior, se pueden verificar los resultados obtenidos de la medición de humedad en granos de café pergamino al inicio y al final de la investigación tanto para las muestras de café pergamino tratadas con la levadura probiótica como para las muestras testigos. De lo anterior, se establece que para el caso de las muestras de café pergamino tratadas con la levadura probiótica, el porcentaje de humedad inicial en promedio fue de 11.6%, mientras que las muestras testigos fue de 12.06%.

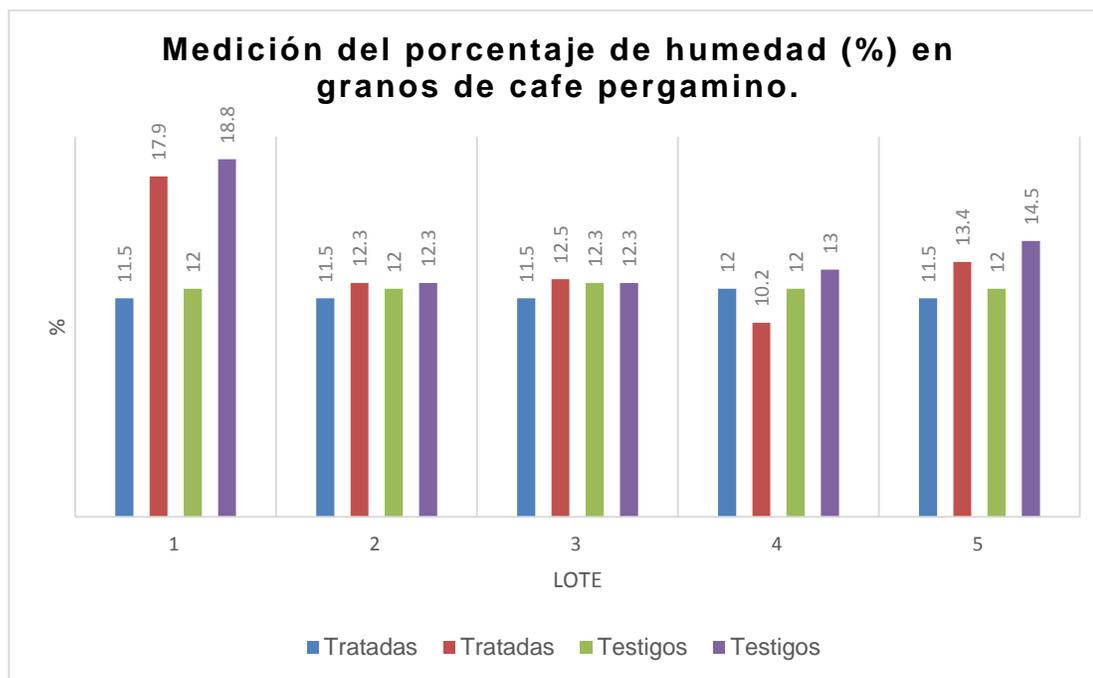
La medición del porcentaje de humedad se efectuó adicionalmente al final de la investigación en el día 90; se identificó que en su mayoría las muestras tratadas con la levadura probiótica presentaron un aumento del porcentaje de humedad, exceptuando la muestra correspondiente al lote número 4, la cual se identificó que disminuyó el porcentaje de humedad obteniendo un resultado de 10.2%, teniendo para dicho lote una variación de 1.8% de humedad, diferencia que se identificó entre la medición de la humedad al inicio (día cero) y al final de la investigación (día noventa).

En promedio el porcentaje de humedad final para las muestras con levadura probiótica al día 90 fue de 13.26%; al verificar la variación existente entre el promedio de la humedad inicial y el promedio de la humedad final para las muestras con levadura, se obtuvo una variación significativa de 1.66%.

Por otra parte, en cuanto a las muestras testigos, al final de la investigación (día noventa), el promedio de la humedad fue de 14.18%; identificando un aumento significativo del porcentaje de humedad para las muestras de los lotes 1, 4 y 5.

Al verificar la variación existente entre el promedio de la humedad inicial y el promedio de la humedad final para las muestras testigos, se obtuvo una variación significativa de 2.12%, mientras que para las muestras tratadas con levadura la diferencia encontrada fue de 1.58%.

En general, se identificó que las muestra testigos al final de la investigación ganaron un mayor porcentaje de humedad, siendo este del 2.12%, en comparación con el aumento de la humedad de las muestras testigos, el cual fue de 1.58%. En el siguiente gráfico se representan los resultados obtenidos de las mediciones del porcentaje de humedad obtenidos para cada uno de los lotes, tanto para las muestras tratadas con la levadura probiótica, como para las muestras testigos de los granos de café pergamino.



**Figura No. 5** Resultados obtenidos de la medición del porcentaje de humedad en granos de café pergamino al inicio (día cero) y final de la investigación (día noventa).

En el gráfico anterior se observa que la tendencia del porcentaje de humedad, es mayor para las muestras testigos, tanto al inicio como al final de la investigación, de igual forma, se puede identificar un aumento de humedad en los granos de café oro tratados con la levadura probiótica, aunque el aumento es menor, en comparación con los testigos, por lo que, se pudo identificar, que la aplicación de la levadura probiótica no interfiere en el incremento de la medición del porcentaje de humedad, sino más bien, el aumento del porcentaje de humedad, está íntimamente relacionado con las condiciones ambientales y con el proceso de secado que los granos tengan.

Por otra parte, en cuanto a los resultados obtenidos en la investigación, para las muestras de café oro, se puede establecer que se han tenido resultados similares, los cuales se detallan a continuación:

**Cuadro No. 13** Resultados de la medición de humedad en granos de café oro, al inicio (día cero) y final de la investigación (día noventa).

<b>Resultados de la medición de humedad para muestras de café oro.</b>				
<b>%Humedad Inicial (día cero)</b>			<b>% Humedad final (día noventa)</b>	
<b>Lote</b>	<b>Tratadas</b>	<b>Testigos</b>	<b>Tratadas</b>	<b>Testigos</b>
6	11.1	11.7	11.1	11.7
7	12	11.7	10.5	11.7
8	11.2	11.5	11.2	13
9	12	12	15.4	17
10	11	11.5	10.3	11.5
<b>Promedio</b>	<b>11.46</b>	<b>11.68</b>	<b>11.7</b>	<b>12.98</b>

En el cuadro anterior se pueden verificar los resultados obtenidos de la medición de humedad en granos de café oro al inicio y al final de la investigación tanto para las muestras tratadas con la levadura probiótica como para las muestras testigos. De lo anterior, se logró establecer que para el caso

de las muestras tratadas con la levadura probiótica, el porcentaje de humedad inicial en promedio fue de 11.46%, mientras que las muestras testigos fue de 11.68%.

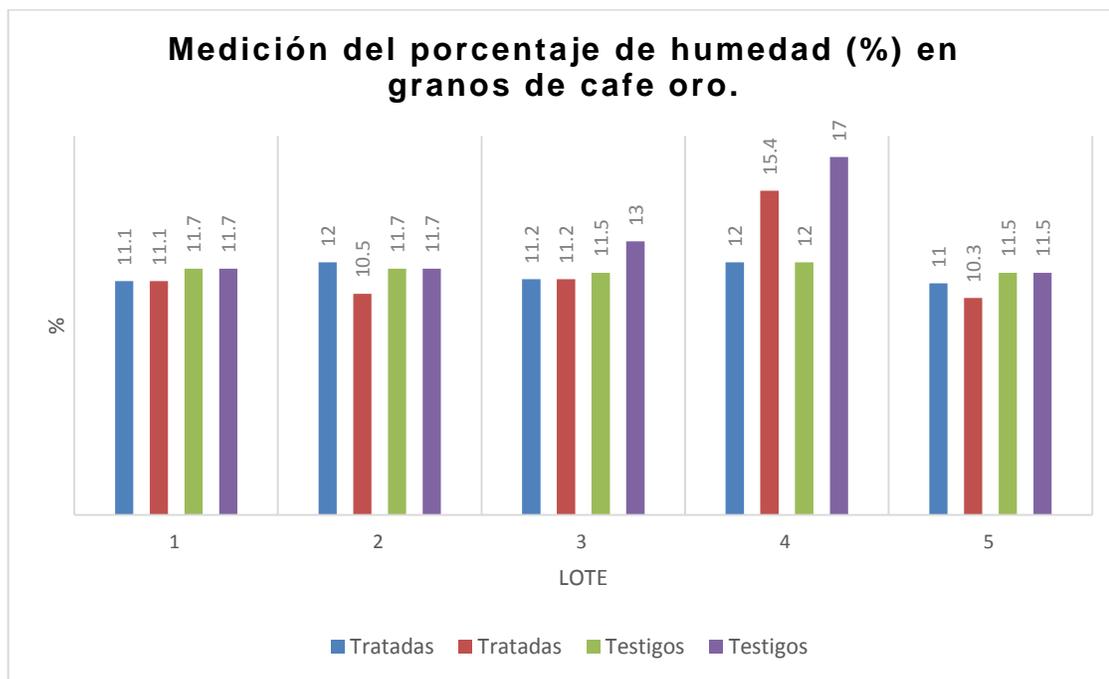
La medición del porcentaje de humedad se efectuó adicionalmente al final de la investigación en el día 90; se identificó que en su mayoría las muestras tratadas con la levadura probiótica presentaron un leve aumento del porcentaje de humedad, exceptuando la muestra correspondiente al lote número 9, para el cual se identificó un aumento significativo de 3.4% (medición inicial: 12%; medición final: 15.4%). En general al día 90 se obtuvo un promedio del porcentaje de humedad del 11.7%, teniendo una variación de 0.24% del porcentaje de humedad entre la medición inicial (día cero) y la medición final (día noventa) para las muestras de café oro tratadas.

Por otra parte, en cuanto a las muestras testigos, para el final de la investigación, el promedio de la humedad fue de 12.98%; identificando un aumento significativo del porcentaje de humedad para la muestra del lote 9, en el cual la medición inicial fue de 12% y la medición final de 17%, por lo que se obtuvo una diferencia significativa del 5%.

Al verificar la variación existente entre el promedio de la humedad inicial (día cero) y el promedio de la humedad final (día noventa) para las muestras testigos, se obtuvo una variación significativa de 1.30%, mientras que para las muestras tratadas con levadura la diferencia fue de 0.24%.

En general se identificó que las muestras testigos al final de la investigación (día noventa) ganaron un mayor porcentaje de humedad, siendo este de 1.30%, en comparación con el promedio de la humedad de las muestras tratadas con levadura probiótica, el cual fue de 0.24%.

En el siguiente gráfico se presentan los resultados obtenidos de las mediciones del porcentaje de humedad obtenidos para cada uno de los lotes, tanto para las muestras tratadas con la levadura probiótica, como para las muestras testigos de los granos de café oro.



**Figura No. 6** Resultados obtenidos de la medición del porcentaje de humedad en granos de café oro al inicio (día cero) y final de la investigación (día noventa)

En el gráfico anterior se observa que la tendencia del porcentaje de humedad, es mayor para las muestras testigos, tanto al inicio como al final de la investigación, de igual forma, se puede identificar un aumento de humedad en los granos de café oro tratados con la levadura probiótica, aunque el aumento es menor, en comparación con los testigos, por lo que, es posible aseverar, que la aplicación de la levadura probiótica no interfiere en el incremento de la medición del porcentaje de humedad, sino más bien, el aumento del porcentaje de humedad, está íntimamente relacionado con las condiciones ambientales y con el proceso de secado que los granos tengan.

### **5.2.1 Cuantificación e identificación de hongos productores de ocratoxina A, en granos de café oro y pergamino.**

Posterior a la aplicación de la levadura probiótica se realizó la cuantificación de hongos productores de ocratoxina, de los cuales la literatura establece que los pertenecientes al género *Penicillium* y *Aspergillus* son considerados como los mayores productores de ocratoxina, por lo que se realizó la siembra de las muestras de café oro y café pergamino en placas con agar PDA (Agar Papa Dextrosa) y de las placas que presentaron crecimiento de hongos, se tomaron muestras representativas para su identificación mediante tinción al fresco, para identificar la presencia de hongos productores de ocratoxina.

Las placas con medio de cultivo fueron inoculadas con extracto de las muestras de granos de café oro y granos de café pergamino, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente. Los días de siembra fueron: 0, 15, 56, 60 y 90 días después de la aplicación de la levadura probiótica.

#### **5.2.1.1 Cuantificación de hongos productores de ocratoxina A en muestras de café.**

Los resultados obtenidos del crecimiento de hongos productores de ocratoxina A, se detallan en los cuadros siguientes, en los cuales se establecen los promedios de crecimiento del número de colonias de *Aspergillus niger* en las muestras tratadas con la levadura probiótica, así como, en las muestras testigos, desde el día 0 hasta el día 90 de la investigación, en granos de café oro y granos de café pergamino, respectivamente.

**Cuadro No. 14** Promedio de crecimiento de colonias de hongos productores de ocratoxina al día cero, en granos de café pergamino.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café pergamino día cero			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
$\Sigma X$	0	0	0
<b>Promedio</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>N</b>	<b>10</b>		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

En el cuadro anterior, se puede identificar que para el día cero, las muestras de café pergamino que fueron tratadas con la levadura probiótica y las muestras testigos no presentaron crecimiento de hongos, por lo que los resultados obtenidos han sido menores de 10 UFC/g, durante la incubación a temperatura ambiente.

**Cuadro No. 15** Promedio de crecimiento de colonias de hongos productores de ocratoxina al día cero, en granos de café oro.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café oro día cero			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
$\Sigma X$	0	0	0
<b>Promedio</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>N</b>	<b>10</b>		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

La cuantificación del número de unidades formadoras de colonias para el día cero, en las muestras de café oro tratadas con la levadura probiótica, así como, las muestras testigos, se ven reflejados en la tabla anterior, en la cual se puede identificar que al igual que las muestras de café pergamino, para el día cero el recuento total de hongos es menor a 10 UFC/g, durante la incubación a temperatura ambiente.

Por lo que se puede establecer que al día cero, tanto las muestras de café oro, como las muestras de café pergamino, después de la aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, a una concentración de  $10^8$  células de levadura/mL, no se presentó crecimiento de hongos tanto para las muestras, como para los testigos, por lo que se determina que se inició con una carga fúngica menor a 10 UFC/g de café oro/café pergamino.

**Cuadro No. 16** Promedio de crecimiento de colonias de hongos productores de ocratoxina al día quince, en granos de café pergamino.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café pergamino día quince			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
1	4	0	4
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
$\Sigma X$	4	0	4
<b>Promedio</b>	<b>0.8</b>	<b>0</b>	<b>0.8</b>
n	10		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

En el cuadro No. 16, se presentan los resultados al día 15 de la aplicación de la levadura probiótica en las muestras de café pergamino y en las muestras testigos, identificando que el único lote que presentó crecimiento es perteneciente al lote 1 de las muestras testigos. Al día 15 no se identificó

crecimiento de hongos productores de ocratoxina en las muestras tratadas con la levadura probiótica, pertenecientes al café pergamino.

**Cuadro No. 17** Promedio de crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* al día quince, en granos de café oro.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café oro día quince			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
6	3	0	3
7	3	0	3
8	0	0	0
9	0	0	0
10	2	0	2
$\Sigma X$	8	0	8
<b>Promedio</b>	<b>1.6</b>	<b>0</b>	<b>1.6</b>
<b>N</b>	<b>10</b>		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

En el cuadro N°17, se observa el crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* a partir del día 15, únicamente en las muestras testigos de los granos de café oro se identificó crecimiento específicamente para los lotes 6, 7 y 10.

Al día 15 no se identificó crecimiento de hongos productores de ocratoxina en las muestras tratadas con la levadura probiótica, para las muestras pertenecientes al café oro.

Al hacer una comparación entre los resultados del café pergamino y los del café oro, se pudo identificar que al día 15 del ensayo, las muestras testigos del café oro presentan un mayor número de colonias fúngicas, así como, un mayor número de lotes con crecimiento.

Los resultados anteriores denotan que al día 15 de la aplicación de la levadura probiótica, es posible identificar cierto grado de protección de la levadura probiótica sobre los granos de café, ya que no se identificó crecimiento fúngico

en comparación con las muestras testigos correspondientes, las que han sido manipuladas de la misma manera y que por consiguiente para el día 15 de monitoreo han presentado crecimiento fúngico.

**Cuadro No. 18** Promedio de crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* al día cincuenta y seis, en granos de café pergamino.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café pergamino día cincuenta y seis.			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
1	7	3	4
2	5	2	3
3	1	0	1
4	3	2	1
5	4	2	2
$\sum X$	20	9	11
<b>Promedio</b>	<b>4</b>	<b>1.8</b>	<b>2.2</b>
n	10		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

Para el día 56 todas las muestras testigos de café pergamino presentaron crecimiento de hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, siendo el lote 1 el que presentó un mayor número de colonias. Para el caso de las muestras de café pergamino tratadas con la levadura probiótica solamente el lote 3 no presentó crecimiento fúngico, el resto de los lotes se identificó con crecimiento de hongos, sin embargo, al compararlo con el crecimiento de las muestras testigos, se pudo identificar que las muestras tratadas con la levadura probiótica presentan un menor recuento de hongos.

**Cuadro No. 19** Promedio de crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* al día cincuenta y seis, en granos de café oro.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café oro día cincuenta y seis			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
6	3	1	2
7	5	1	4
8	2	0	2
9	3	0	3
10	5	3	2
$\Sigma X$	18	5	13
<b>Promedio</b>	<b>3.6</b>	<b>1</b>	<b>2.6</b>
n	10		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

Al día 56 del ensayo, todas las muestras testigos de café oro presentaron crecimiento de hongos, asimismo, las muestras tratadas con levadura probiótica correspondientes a los lotes 6, 7 y 10 presentaron crecimiento, siendo los lotes 8 y 9 los únicos que no presentaron crecimiento fúngico.

Por otra parte, al hacer una comparación entre los dos tipos de cafés, al día 56, se pudo observar crecimiento de colonias de hongos en los granos de café oro y granos de café pergamino tratados con la levadura probiótica, en ambos casos, es importante establecer que hubo mayor número de colonias en los granos de café pergamino por un aumento de 4 colonias en comparación con los granos de café oro. Sin embargo, se mantiene por encima los crecimientos de colonias en las testigos en ambos casos.

**Cuadro No. 20** Promedio de crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* al día sesenta, en granos de café pergamino.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café pergamino día sesenta			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
1	10	5	5

2	9	5	4
3	2	2	0
4	6	4	2
5	7	4	3
$\Sigma X$	34	20	14
<b>Promedio</b>	<b>6.8</b>	<b>4</b>	<b>2.8</b>
<b>n</b>	<b>10</b>		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

En el cuadro No. 20, se puede identificar los resultados del ensayo al día 60 para las muestras de café pergamino, los resultados obtenidos muestran que los testigos como las muestras tratadas con levadura probiótica cuentan con crecimiento fúngico, sin embargo, las muestras testigos presentaron un mayor crecimiento en comparación con las muestras tratadas con levadura probiótica.

**Cuadro No. 21** Promedio de crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* al día sesenta, en granos de café oro.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café oro día sesenta			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
6	9	3	6
7	6	2	4
8	4	1	3
9	5	3	2
10	10	5	5
$\Sigma X$	34	14	20
<b>Promedio</b>	<b>6.8</b>	<b>2.8</b>	<b>4</b>
<b>n</b>	<b>10</b>		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

En el cuadro No. 21, se muestran los resultados de crecimiento de colonias de *Aspergillus* al día sesenta, en granos de café oro, al igual que los resultados para el café pergamino en el día 60, las muestras de café oro tanto las tratadas con la levadura probiótica como los testigos, presentan crecimiento fúngico. La

tendencia en las muestras testigos es a un mayor crecimiento en comparación con las muestras tratadas con la levadura probiótica, lo cual es bastante notable.

Por otra parte, al hacer una comparación entre los resultados del café pergamino con los resultados del café oro en las muestras tratadas con levadura probiótica, se pudo identificar que el café pergamino ha presentado una mayor proporción de crecimiento de hongos en comparación con las muestras del café oro.

**Cuadro No. 22** Promedio de crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* al día noventa en granos de café pergamino.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café pergamino día noventa			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
1	12	6	6
2	12	7	5
3	4	4	0
4	9	7	2
5	10	6	4
$\Sigma X$	47	30	17
<b>Promedio</b>	<b>9.4</b>	<b>6</b>	<b>3.4</b>
<b>N</b>	<b>10</b>		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

Al día 90 del análisis, el crecimiento de hongos continuó siendo más notable en las muestras testigos, para el café pergamino, que en las muestras tratadas con levadura probiótica, obteniendo un promedio de número de colonias para los testigos de 9.4 UFC/g, mientras que para las tratadas con la levadura probiótica fue de 6.0 UFC/g y una diferencia significativa de 3.4 UFC/g.

**Cuadro No. 23** Promedio de crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* al día noventa en granos de café oro.

Promedio del número de colonias presentes en granos de café oro día noventa			
Lotes	Testigo (UFC/g)	Tratamiento con levadura (UFC/g)	Diferencias (X)
6	12	5	7
7	7	3	4
8	6	3	3
9	9	5	4
10	15	7	8
$\sum X$	49	23	26
<b>Promedio</b>	<b>9.8</b>	<b>4.6</b>	<b>5.2</b>
<b>N</b>	<b>10</b>		
<b>G.L</b>	<b>9</b>		

De igual manera en el cuadro No. 23, se detallan los resultados de las muestras de café pergamino y de café oro al día 90 del análisis, identificando que el mayor número de colonias se ve reflejado en las muestras testigos más que en las muestras tratadas con levadura probiótica.

Al hacer una comparación entre los resultados de las muestras tratadas con levadura probiótica para café pergamino y para el café oro, la tendencia continúa siendo con una mayor cantidad de colonias en el café pergamino que en el café oro.

A continuación, se presenta un cuadro resumen que detalla los promedios de colonias de hongos durante los días 0, 15, 56, 60 y 90 días del ensayo, además se ha determinado el valor de la desviación estándar y el valor de T calculado.

**Cuadro No. 24** Resumen de promedios de crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* desde el inicio (día cero) al final de la investigación (día noventa).

Día de análisis	Tipo de grano	Tipo de muestra	Promedio	S <sup>2</sup>	Sd	Tc
0 días	Pergamino	Testigo	0	0	0	0
		Tratadas	0	0	0	0
	Oro	Testigo	0	0	0	0
		Tratadas	0	0	0	0
15 días	Pergamino	Testigo	0.4	1.6	0.4	1
		Tratadas	0	0	0	0
	Oro	Testigo	0.8	1.73	0.41	1.92
		Tratadas	0	0	0	0
56 días	Pergamino	Testigo	2	6.66	0.81	2.45
		Tratadas	0.9	1.43	0.37	-2.38
	Oro	Testigo	1.8	4.4	0.66	2.71
		Tratadas	0.5	0.94	0.3	-1.63
60 días	Pergamino	Testigo	3.4	17.15	1.3	2.6
		Tratadas	2	5.11	0.71	-2.8
	Oro	Testigo	3.4	15.82	1.25	2.7
		Tratadas	1.4	3.15	0.56	-2.49
90 días	Pergamino	Testigo	4.7	29.34	1.71	2.74
		Tratadas	3	10.66	1.03	-2.9
	Oro	Testigo	4.9	32.76	1.81	2.71
		Tratadas	2.3	7.12	0.84	-2.73

En el caso del cuadro anterior y con Tc (calculado) se aprueban todos aquellos valores que estén más cercanos al valor cero, ya que es más probable que ocurra ese fenómeno o que funcione el tratamiento. Los tratamientos que se aprueban o que están más cerca de cero serían: T1 (pergamino) y T2 (Oro) a los 15 días, teniendo un Tc de cero en ambos casos. Para los siguientes días de medición, aunque se pudo denotar una disminución de protección del grano, se evidenció que hay una ventaja de las muestras tratadas contra los testigos, en ese caso, es importante mencionar que para el día 56 en los granos de café pergamino que fueron tratados con la levadura probiótica, éstos presentaron un

valor de -2.38 y los testigos de 2.45; para los granos de café oro los testigos presentaron un valor de 2.71 y las muestras tratadas de -1.63, para este caso, se observó cierta inhibición de crecimientos de colonias en granos oro al día 56 de medición.

Para los días 60 y 90 se pudo observar que los resultados se encuentran con valores elevados mayores a un valor de 2.0, para lo cual, se determinó que ya no es probable que ocurra protección con la aplicación de la levadura probiótica a la concentración de  $10^8$  células de levadura/mL.

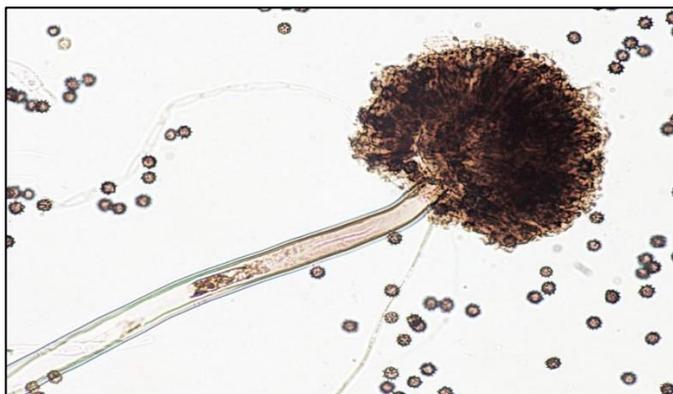
#### **5.2.1.2 Identificación de hongos productores de ocratoxina A en muestras de café.**

Posterior a la cuantificación de los hongos productores de ocratoxina, se realizó la identificación de los hongos del género *Aspergillus niger*, observando al microscopio las características representativas de los hongos, entre ellas: cabezas conidiales mostrando conidióforos hialinos, vesículas globosas, esterigmas en una o en dos series, conidios globosos.

La figura No. 7 corresponde a la identificación realizada en muestras de café pergamino vistas en el microscopio en el lente 100 X y la figura No. 8 corresponde a la anatomía microscópica de los hongos del género *Aspergillus* detallados en la literatura, para lo cual se pudo identificar similitud entre ambas anatomías microscópicas.



**Figura No. 7** *Aspergillus* visto al microscopio.



**Figura No. 8** *Aspergillus* anatomía microscópica.

### 5.3 Relación del crecimiento de colonias de *Aspergillus* con el aumento de humedad.

Se realizó este apartado con el fin de destacar la relación del aumento de humedad en los granos de café, con la aparición de hongos como *Aspergillus* en cuartos de almacenamiento.

A continuación, se muestran los resultados de las mediciones de humedad inicial (día cero) y humedad final (día noventa), lo cual fue efectuada en los granos tratados con levadura y los testigos, en granos de café pergamino y en granos de café oro respectivamente:

**Cuadro No. 25** Crecimiento de colonias de *Aspergillus spp* y su relación con la humedad al inicio y final de la investigación en café pergamino.

Resultados obtenidos del crecimiento fúngico en muestras de café pergamino								
Lote	Inicio (día cero)				Final (día noventa)			
	Muestra Testigo (UFC)	Muestra Testigo (%H)	Muestra Tratada (UFC)	Muestra Tratada (%H)	Muestra Testigo (UFC)	Muestra Testigo (%H)	Muestra Tratada (UFC)	Muestra Tratada (%H)
1	0	12	0	11.5	12	18.8	6	17.9
2	0	12	0	11.5	12	12.3	7	12.3
3	0	12.3	0	11.5	4	12.3	4	12.5

4	0	12	0	12	9	13	7	10.2
5	0	12	0	11.5	10	14.5	6	13.4

En el cuadro anterior se aprecian los resultados de los recuentos de colonias de hongos en granos de café pergamino, tanto en las muestras testigos como para las muestras tratados con la levadura probiótica. Al inicio del análisis no se evidenció crecimiento de hongos, sin embargo, es evidente el crecimiento de hongos al día 90 de lectura en las muestras testigos como en las muestras tratados con levadura probiótica; a la misma fecha, los testigos superaron en UFC a las muestras tratadas en los lotes 1, 2, 4 y 5; las muestras tratadas con levadura probiótica que presentaron el aumento en colonias de hongos, se les observó, además, un aumento en la humedad de por lo menos una unidad. Excluyendo al lote 3 que tuvo el mismo crecimiento de UFC a lo largo de la investigación y el porcentaje de humedad en el grano de café pergamino se mantuvo igual en la muestra testigo mientras que en las muestras tratadas solo de identificó un aumento del 1%.

**Cuadro No. 26** Crecimiento de colonias de *Aspergillus spp* y su relación con la humedad al inicio y final de la investigación en café oro.

Resultados obtenidos del crecimiento fúngico en muestras de café oro								
Inicio (día cero)					Final (día noventa)			
Lote	Muestra Testigo (UFC)	Muestra Testigo (%H)	Muestra Tratada (UFC)	Muestra Tratada (%H)	Muestra Testigo (UFC)	Muestra Testigo (%H)	Muestra Tratada (UFC)	Muestra Tratada (%H)
6	0	11.7	0	11.1	12	11.7	5	11.1
7	0	11.7	0	12	7	11.7	3	10.5
8	0	11.5	0	11.2	6	13	3	11.2
9	0	12	0	12	9	17	5	15.4
10	0	11.5	0	11	15	11.5	7	10.3

En el cuadro anterior se aprecia que no hubo un aumento significativo en el porcentaje de humedad de cada lote analizado, sin embargo, hubo crecimiento de UFC mayor en las muestras testigos que en las muestras tratadas con la levadura probiótica al día 90 de la evaluación. Lo que advierte que se tuvo crecimiento de hongos en los granos de café oro, después de 90 días de almacenamiento.

Al realizar una comparación entre las muestras testigos de los granos de café pergamino y los granos de café oro, se pudo observar mayor crecimiento de UFC en los granos de café pergamino tanto en las muestras tratadas con la levadura probiótica como en las muestras testigos, lo que permitió inferir que existe la probabilidad que sea por la presencia del pergamino o pulpa que se secó sobre la semilla y que al ser almacenada de esta forma, aumento su humedad interna dentro del cuarto de almacenamiento.

En los granos de café oro no se evidenció un aumento significativo en el porcentaje de humedad en comparación con los granos de café pergamino.

#### **5.4 Cuantificación de la presencia de Ocratoxina A en granos de café oro y pergamino.**

En los cuadros No. 27, 28, 29, 30, 31 y 32, se muestran los resultados del recuento de ocratoxina A en los granos de café pergamino y oro respectivamente.

Es importante recordar que los valores de transmitancia pueden ir de 0 a 1, estableciendo que el valor de cero es correspondiente a que no pasa nada de luz y el valor de uno correspondiente a que el haz de luz para por completo.

Obsérvese que la absorbancia aumenta conforme disminuye la transmitancia.

**Cuadro No. 27** Recuento de OTA durante el día cero, en granos de café pergamino después de la aplicación de *S. boulardii*.

Recuento de ocratoxina A en granos de café pergamino en el día cero de análisis				
Lote	Testigos		Tratadas	
	Abs.	Ocratoxina (ppb)	Abs.	Ocratoxina (ppb)
1	1.057	<LOD(1.9ppb)	1.057	<LOD(1.9ppb)
2	1.03	<LOD(1.9ppb)	1.03	<LOD(1.9ppb)
3	0.95	<LOD(1.9ppb)	0.95	<LOD(1.9ppb)
4	0.9	<LOD(1.9ppb)	0.9	<LOD(1.9ppb)
5	1.06	<LOD(1.9ppb)	1.06	<LOD(1.9ppb)

El recuento de ocratoxina A en granos de café pergamino al día cero, tanto para las muestras testigos como para las muestras tratadas es relativamente similar ya que los valores de absorbancia obtenidos para los testigos como para las muestras tratadas ha sido el mismo, por lo que al inicio del análisis se parte de recuentos iguales de ocratoxina A.

**Cuadro No. 28** Recuento de OTA durante el día quince, en granos de café pergamino después de la aplicación de *S. boulardii*.

Recuento de ocratoxina A en granos de café pergamino en el día quince de análisis				
Lote	Testigos		Tratadas	
	Abs.	Ocratoxina (ppb)	Abs.	Ocratoxina (ppb)
1	1.057	<LOD(1.9ppb)	1.22	<LOD(1.9ppb)
2	0.92	<LOD(1.9ppb)	1.116	<LOD(1.9ppb)
3	0.84	<LOD(1.9ppb)	1.262	<LOD(1.9ppb)
4	0.9	<LOD(1.9ppb)	1.158	<LOD(1.9ppb)
5	0.93	<LOD(1.9ppb)	1.282	<LOD(1.9ppb)

En el cuadro anterior podemos notar que a los 15 días los granos de café pergamino con la levadura probiótica, sobrepasaron el valor de 1 en absorbancia, lo que significa que la concentración de ocratoxina A es menor en

las muestras de café pergamino en comparación con las muestras testigos, ya que solo el lote 1 de los testigos obtuvo un valor de 1.057 de absorbancia y las demás quedaron por debajo de 1, lo cual indica que la concentración de Ocratoxina A es mayor en los testigos que en las muestras tratadas con levadura probiótica.

**Cuadro No. 29** Recuento de OTA durante el día noventa, en granos de café pergamino después de la aplicación de *S. boulardii*.

Recuento de ocratoxina A en granos de café pergamino en el día noventa de análisis				
Lote	Testigos		Tratadas	
	Abs.	Ocratoxina (ppb)	Abs.	Ocratoxina (ppb)
1	0.073	63.45	0.193	40.04
2	0.065	69.55	0.062	72.18
3	0.063	71.28	0.057	77.08
4	0.072	62.45	0.053	81.57
5	0.065	69.55	0.056	78.16

Al día 90 de análisis, tanto los testigos como las muestras tratadas con levadura probiótica presentaron un valor de transmitancia muy por debajo de cero, esto se traduce que a los 90 días del ensayo tanto los testigos como las muestras tratadas con levadura tienen concentraciones altas de OTA, en este punto podemos asumir que la levadura ya no ejerce su eficacia protectora.

**Cuadro No. 30** Recuento de OTA durante el día cero, en granos de café oro después de la aplicación de *S. boulardii*.

Recuento de ocratoxina A en granos de café oro en el día cero de análisis				
Lote	Testigos		Tratadas	
	Abs.	Ocratoxina (ppb)	Abs.	Ocratoxina (ppb)
6	0.957	<LOD(1.9ppb)	1.1	<LOD(1.9ppb)
7	0.9	<LOD(1.9ppb)	1.08	<LOD(1.9ppb)
8	0.957	<LOD(1.9ppb)	0.957	<LOD(1.9ppb)

9	1.06	<LOD(1.9ppb)	0.979	<LOD(1.9ppb)
10	1.02	<LOD(1.9ppb)	1.059	<LOD(1.9ppb)

En el día cero del análisis de las muestras de café oro, se identifica discrepancia en los valores obtenidos de las mediciones absorbancia, siendo los lotes 6, 7 y 8 de los testigos los que presentan valores de absorbancia por debajo del valor de 1, lo que significa una elevada cantidad de ocratoxina A, mientras que los lotes 9 y 10 de los testigos se mantienen con baja cantidad de ocratoxina, ya que los valores de absorbancia son mayores a 1. Por otra parte, en relación con las muestras tratadas con levadura probiótica se puede evidenciar que únicamente los lotes 8 y 9 presentan valores de absorbancia por debajo del valor de 1; mientras que las muestras tratadas con levadura probiótica, pertenecientes a los lotes 6, 7 y 10 presentan valores mayores de absorbancia mayores a 1, considerando un valor bajo de ocratoxina A.

**Cuadro No. 31** Recuento de OTA durante el día quince, en granos de café oro después de la aplicación de *S. boulardii*.

Recuento de ocratoxina A en granos de café oro en el día quince de análisis				
Lote	Testigos		Tratadas	
	Abs.	Ocratoxina (ppb)	Abs.	Ocratoxina (ppb)
6	0.926	2.11	1.146	<LOD(1.9ppb)
7	0.854	3.35	1.08	<LOD(1.9ppb)
8	0.957	<LOD(1.9ppb)	0.957	<LOD(1.9ppb)
9	0.979	<LOD(1.9ppb)	0.979	<LOD(1.9ppb)
10	0.93	2.04	1.059	<LOD(1.9ppb)

A los 15 días del ensayo, se observa que en los granos de café oro tratados con la levadura probiótica, solamente los lotes 8 y 9 mostraron lecturas por debajo de cero, mientras los lotes 6, 7 y 10 sobrepasaron el valor de absorbancia de 1, es decir, se identifica un valor bajo de ocratoxina A. En relación con los testigos,

se identifica que mostraron niveles de absorbancia por debajo del valor de 1 en todos los lotes, es decir presentan una elevada concentración de ocratoxina A. Por lo tanto, al día 15 del ensayo se puede determinar que el efecto protector de la levadura probiótica en los granos de café oro, únicamente se puede evidenciar en las muestras de los lotes 6, 7 y 10, mientras que los lotes 8 y 9 presentan resultados similares al de los testigos.

**Cuadro No. 32** Recuento de OTA durante el día noventa, en granos de café oro después de la aplicación de *S. boulardii*.

Recuento de ocratoxina A en granos de café oro en el día noventa de análisis				
Lote	Testigos		Tratadas	
	Abs.	Ocratoxina (ppb)	Abs.	Ocratoxina (ppb)
6	0.078	60.19	0.057	77.08
7	0.085	56.18	0.055	79.26
8	0.063	71.28	0.057	77.08
9	0.065	69.55	0.058	76.05
10	0.074	62.77	0.103	48.06

En los granos de café oro a los 90 días del ensayo, tanto las muestras tratadas como los testigos presentaron niveles de absorbancia muy por debajo de cero lo que se traduce a una alta concentración de Ocratoxina A, por lo anterior, puede establecerse que al igual que en los granos de café pergamino donde todas las muestras tratadas con levadura probiótica y los testigos mostraron niveles de absorbancia por debajo cero, se puede determinar que a los 90 días del ensayo, la eficacia de protección de la levadura sobre los granos de café oro y pergamino es nula.

Con los datos anteriores se determinó que para los días cero y quince del ensayo las mediciones de ppb de OTA se mantuvieron por debajo de 1,9 ppb lo cual cumple con el límite máximo admisible para OTA de 5 ppb en café tostado y molido según parámetros establecidos por la Unión Europea.

### **5.5 Determinación de las características sensoriales de los granos de café oro y pergamino.**

La determinación de las características sensoriales de los granos de café oro y pergamino no fue posible efectuarse, debido a la pandemia por Covid-19, ya que la Asociación Salvadoreña de Catadores de Café no se encontró abierta al momento en que se pretendía realizar la catación de las muestras, por otra parte, el catador con el que se contaba para llevar a cabo este objetivo falleció por efectos del Covid-19, por lo que no se efectuó esta actividad como inicialmente se había planteado.

En relación a lo antes expuesto, se establece la incertidumbre en función que la levadura probiótica puede o no afectar las características sensoriales del café y que, si esto puede o no favorecer la aceptabilidad por parte del consumidor final, es una pregunta que valdría la pena poder ser retomada en próximos trabajos de investigación ya que la aplicación de ciertas sustancias como en este caso, la aplicación de *Saccharomyces boulardii*, puede ejercer un efecto significativo en el olor, sabor, consistencia, grado de acidez y otras características organolépticas del producto final.

### **5.6 Análisis costo-efectividad de la aplicación del método con *Saccharomyces boulardii*.**

El análisis de costo-efectividad del método con *Saccharomyces boulardii*, se detalla en el cuadro N°33, en el cual se muestran los tratamientos con el porcentaje promedio de efectividad por cada día de medición de OTA en los granos de café pergamino, café oro y los testigos.

**Cuadro No. 33** Porcentaje promedio de efectividad y sus costos variables por tipo de tratamiento.

Tratamiento	Día de medición	% promedio de efectividad	Costo variable (\$)
T1	0	103.4	5.42
	15	104.42	0
	90	6.6	0
T2	0	99.94	5.42
	15	120.76	0
	90	8.42	0
Testigo (café oro)	0	97.88	N/A
	15	92.92	
	90	7.3	
Testigo (café pergamino)	0	99.94	N/A
	15	92.94	
	90	6.76	

Se realizó el análisis de dominancia el cual se efectuó, primero, ordenando los tratamientos de menor a mayor costo variable y un menor porcentaje de efectividad, lo anterior se detalla en el cuadro No. 34 en el que se establecen los tratamientos con cada día de medición de OTA para determinar el Índice Costo-Efectividad.

**Cuadro No. 34** Tratamientos con cada día de medición para OTA para determinar el Índice Costo-Efectividad.

Tratamiento	Día de medición	% promedio de efectividad	Costo Variable (\$)	Índice C/E (\$/% de efectividad)
T1	0	103.4	5.42	0.052
	15	104.42	5.42	<b>0.051</b>
	90	6.6	5.42	0.821

T2	0	99.94	5.42	0.054
	15	120.76	5.42	<b>0.044</b>
	90	8.42	5.42	0.643
Testigo (café oro)	0	97.88	0	0
	15	92.92	0	0
	90	7.3	0	0
Testigo (café pergamino)	0	99.94	0	0
	15	92.94	0	0
	90	6.76	0	0

Para seleccionar el tratamiento más económico y de mayor efectividad, a partir del cuadro anterior, es importante recordar que se hizo la aplicación de la levadura una sola vez en el día cero de cada tratamiento, excepto en los testigos. Motivo por el cual no aparecen los valores de los costos en los días 15 y 90 de cada tratamiento; ya que uno de los objetivos ha sido observar los días control de la levadura sobre la producción de OTA en el grano de café con solo una aplicación.

Para determinar cuál tratamiento obtuvo mayor efectividad se selecciona aquel cuyo índice C/E es igual a cero o el valor más bajo. Dado el caso se aceptan los tratamientos 1 y 2 al día 15 cada uno con valores de 0.051 y 0.044 respectivamente.

**CAPÍTULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Se concluye que la bodega de almacenamiento del beneficio cumple con las recomendaciones emitidas por las asociaciones cafetaleras para el almacenamiento adecuado del café y así evitar producción de hongos sobre los granos.
2. La aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, ha permitido identificar aspectos importantes en relación con la disminución de la presencia de hongos ocratoxigénicos tales como los del género *Aspergillus* al día 15 del análisis en condiciones de temperatura ambiente.
3. Con relación a los resultados obtenidos de la medición del porcentaje de humedad al inicio (día cero) y al final de la investigación (día noventa), se determinó que la aplicación de la levadura probiótica no interfiere en el incremento de la medición del porcentaje de humedad, sino más bien, el aumento del porcentaje de humedad está íntimamente relacionado con las condiciones ambientales y con el proceso de secado que los granos tengan.
4. En las placas con medio de cultivo PDA se identificaron como hongos productores de OTA a colonias del género *Aspergillus niger*, observando al microscopio cabezas conidiales mostrando conidióforos hialinos, vesículas globosas, esterigmas en una o en dos series, conidios globosos.
5. Para el caso de los crecimientos de UFC en todos los ensayos y al calcular el valor de Tc (calculado) se aprueban todos aquellos valores que estén más cerca del valor cero, ya que es más probable que ocurra ese fenómeno o que funcione el tratamiento, en ese caso se acepta T1 (pergamino) y T2 (Oro) ambos a los 15 días teniendo un valor de Tc de cero en ambos casos.
6. Se concluye que para los días cero y quince del ensayo, las mediciones de ppb de OTA se mantuvieron por debajo de 1,9 ppb lo cual permite

establecer que cumple con el límite máximo admisible para OTA de 5 ppb en café tostado y molido según lo establecido por la Unión Europea.

7. Para el día 90 del ensayo tanto los testigos como las muestras tratadas con la levadura probiótica, en los granos de café oro y pergamino, tuvieron concentraciones por arriba del límite admisible de ocratoxina A establecido por la Unión Europea, por lo tanto, se puede establecer que la eficacia de protección es nula.
8. En cuanto a las características sensoriales de los granos de café oro y café pergamino no fue posible efectuarse, debido a la pandemia por Covid-19, por lo que queda la incertidumbre en función de determinar si la levadura probiótica puede o no afectar las características sensoriales del café y si esto puede o no favorecer la aceptabilidad por parte del consumidor final.
9. El análisis costo efectividad permitió determinar el tratamiento que obtuvo mayor efectividad seleccionando aquel cuyo índice C/E es igual al valor cero o el valor más bajo. Dado el caso se aceptaron los tratamientos 1 y 2 al día 15 de la investigación, con valores de 0.051 y 0.044 respectivamente.

**CAPÍTULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## RECOMENDACIONES

1. Elaborar propuesta de normativa salvadoreña en la cual se establezcan los límites máximos permitidos para la presencia de ocratoxina A en granos de café de producción local y extranjera, así mismo, es importante que se exija su cumplimiento a los diferentes productores y comercializadores de café en El Salvador.
2. Que las pruebas para la determinación de Ocratoxina A se encuentren dentro de los parámetros de cumplimiento de calidad e inocuidad y que a su vez sean de estricta exigencia y cumplimiento para los productos a base de café que se importan y comercializan en El Salvador.
3. Es recomendable que en El Salvador se establezca un centro de vigilancia sanitaria, enfocado en realizar monitoreo continuo de los niveles de ocratoxinas y otras micotoxinas, que se encuentran contenidas en los alimentos de consumo salvadoreño, el cual tenga como principal objetivo, prevenir la aparición de enfermedades asociadas con el consumo de alimentos con potencial contenido de las toxinas antes mencionadas.
4. Capacitar a los productores nacionales de café en materia de Buenas Prácticas Agrícolas y beneficiando de café, así como, en sistemas HACCP, con el objeto de establecer puntos críticos de control en las diferentes etapas de la fabricación y beneficiado del café, ya que, juegan un papel muy importante en la calidad final del producto.
5. Realizar la validación del método de aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, con el objeto, que pueda realizarse la transferencia del método a los diferentes productores de café para su aplicación.
6. Que la Universidad de El Salvador, incentive los procesos de investigación científica para la identificación de enfermedades asociadas

al consumo de alimentos con un alto contenido de Ocratoxina, lo cual puede ser de mucha relevancia, el poder identificar cifras nacionales que demuestren la relación entre el consumo de OTA y las enfermedades asociadas, resultando de mucho interés para que el Ministerio de Salud de El Salvador establezca medidas de minimización y prevención de riesgos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. y Velázquez, O. (2009) Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Biología. México D.F., 2009.
2. Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO y la OMS y la Organización Mundial de la Salud. (1995). Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes: cuadragésimo cuarto informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Organización Mundial de la Salud. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37246/WHO\\_TRS\\_859.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37246/WHO_TRS_859.pdf)
3. Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO y la OMS y la Organización Mundial de la Salud. (2009). Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. CXS 193-1995. Normas Internacionales de los Alimentos. Codex Alimentarius. [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS\\_193s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193s.pdf)
4. Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2003). Norma Salvadoreña. Estándares de Calidad para el Café de Comercialización Nacional e Internacional. (NSO 67.31.01:03). <https://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/NORMAS/CAFE/EDICIONFINALCAFEVERDE.pdf>
5. Concejo Salvadoreño del café. (mayo 30, 2019). Estadísticas Cafetaleras de El Salvador. Variación de Historial de Producción de Café. <http://www.csc.gob.sv/>

6. Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E., & Porat, R. (2002). Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*, 92(4), 393–399. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.4.393>
7. ELIKA. (2013). Ocratoxina A (ficha técnica). ELIKA. <https://alimentacion-animal.elika.eus/wp-content/uploads/sites/6/2017/12/OCRATOXINA-A-2012-maquetado.pdf>
8. Franco, H., Vega, A., Reyes, S., De León, J., Bonilla, A. (2014). Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64(1), 42-49. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222014000100006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222014000100006&lng=es&tlng=es).
9. Leonard, H. (2008). Criterios de selección y mecanismos de acción de cepas de levadura para uso como aditivo probiótico en animales. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, XLII (1-3), 38-45. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120667006>
10. López, A., Jiménez, A., Ezpezeleta, O., Bello, J. (2000). Efectos Tóxicos de la Ocratoxina A. *Revista de Toxicología*, (17), 61-69. [http://www.adiveter.com/ftp\\_public/articulo804.pdf](http://www.adiveter.com/ftp_public/articulo804.pdf)
11. Mally, A., Dekant, W. (2009). Mycotoxins and the kidney: modes of action for renal tumor formation by ochratoxin A in rodents. *Molecular nutrition & food research*, 53(4), 467–478. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800149>
12. Melo, P., Carvalho, D., Pedroni, A., Soccol, V., Neto, E., Woiciechowski, A., Soccol, C. (2016). Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. *International Journal of Food Science and Technology*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.13142>

13. Miranda, C., Ortiz, E., Arvizu, S., Ramiro, J., Aldrete, J., Martínez R. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México. *Revista SciELO* 49(7), 759-773. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952015000700005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952015000700005&lng=es&tlng=es).
14. Moreno, E. (1988). Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados (1ª ed.). Universidad Autónoma de México.
15. Organización Internacional de Estandarización. (1995). Determinación del Contenido de Humedad. Método de Rutina (ISO 1447). <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/6044/4203fddfd5b476baa72b1123fb250b3/SIST-ISO-1447-1995.pdf>
16. Organización Internacional de Estandarización. (2009). Cereales y productos derivados. Toma de muestras (ISO 24333). [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_iso\\_24333.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_24333.pdf)
17. Organización Internacional de Estandarización. (2017). Café verde en sacos. Muestreo. (ISO 4072). <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:4072:ed-1:v1:en>
18. Pardo, S., Galvagno, M., Cerruti, P. (2009). Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del pre acondicionamiento fisiológico. *Revista Iberoamericana de Micología* 26(2),155-160. <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-estudios-viabilidad-vitalidad-frente-al-13139640>
19. Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. y Pavlovic, M. (2000). Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. Organización Mundial de la Salud. Recopilación de artículos No. 2, 2000. [http://whqlibdoc.who.int/boletin/2000/RA\\_2000\\_2\\_80-92\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/boletin/2000/RA_2000_2_80-92_spa.pdf)
20. Pimenta, R. S., Silva, F. L., Silva, J. F., Morais, P. B., Braga, D. T., Rosa, C. A., Corrêa, A., Jr. (2008). Biological control of *Penicillium italicum*, P.

- digitatum and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 39(1), 85–90.  
<https://doi.org/10.1590/S1517-838220080001000020>
21. Puerta, G. I. (2008). Riesgos para la calidad y la inocuidad del café en el secado. *Avances Técnicos Revista Cenicafe* (371), 2-8.  
<https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/399/1/avt0371.pdf>
22. Quintana, E. M., Guerrero, F. A., Chaves, J. A. (2007). Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA. *Revista SciELO*, 57(2), 168-172.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222007000200010&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000200010&lng=es&tlng=es).
23. Ramírez, J. A. (2006). Documento integrado realizado en el beneficio Santiago Atitlán como contribuciones para mejorar la producción de café en Santiago Atitlán, Sololá. [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos Guatemala, Facultad de Agronomía]. <https://repositoriosiidca.csuca.org/>
24. Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A., Hardisson de la Torre, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Revista de Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215-1226.  
[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112011000600004&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000600004&lng=es&tlng=es).
25. Solís, L. (2017). Presentación de un diseño e innovación de la fermentación del café en el procesamiento del café utilizando levaduras. [Presentación de PowerPoint]. <https://www.luxia.coffee/ftc>
26. Unión Europea. (2006). Reglamento (CE) No 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea L*, 364(5), 20.

27. Urbano, G. R., Taniwaki, M. H., Leitão, M. F., Vicentini, M. C. (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of food protection*, 64(8), 1226–1230. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.8.1226>
28. Vallejos, C. (2006). Estudios comparativos para la determinación de Ocratoxina A en granos de café verde. *Central American Journals Online*, (73), 60–76. <https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i73.3720>
29. Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., Jespersen, L. (2004). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiology*, (101), 29-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039>
30. Zarco, E. (2003). *Manual del Caficultor*. Ed. Fundación PROCAFE. Nueva San Salvador, El Salvador, 78-86. <https://biblioteca.ugb.edu.sv/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=6636>

## **GLOSARIO**

## GLOSARIO

- **Actividad del agua (aw):** Medida del agua disponible en un sustrato, equivalente a la humedad relativa en equilibrio.
- **Aflatoxina:** Toxina producida por el hongo *Aspergillus flavus*.
- **Beneficio húmedo:** Se realiza mediante la utilización de agua. Comprende el despulpado, desmucilaginado o la fermentación y el lavado y el secado. Por esta vía se obtienen los llamados cafés lavados, finos o suaves.
- **Beneficio del Café:** Conjunto de operaciones realizadas para transformar el café cereza en pergamino seco.
- **Buenas Prácticas Agrícolas (BPA):** Utilización sostenible de los recursos naturales básicos para la producción, en forma benévola, de productos agrícolas alimentarios y no alimentarios inocuos y saludables, a la vez que se procuran la viabilidad económica y la estabilidad social.
- **Café Cereza:** Es el fruto del arbusto de café –cafeto-, que como tal se recoge en las fincas, en las épocas de cosecha, en las zonas cafeteras y luego se somete a un proceso de adecuación para que pueda ser comercializado (beneficio húmedo), el cual se realiza en la misma finca cafetera.
- **Cata:** Acción por la que se clasifica un café probándolo y valorando una serie de características.
- **Catación de Café:** Es el método usado para medir el aroma, el sabor y la sanidad del café. Mediante las evaluaciones sensoriales se pueden identificar los defectos presentes en la bebida de café, conocer la intensidad de una característica sensorial como la acidez y el dulzor, reconocer y calificar el sabor y el aroma, y de igual forma, medir la calidad global del producto.
- **Catador:** Son personas que miden y evalúan la calidad del café mediante los sentidos de la vista, el olfato y el gusto. Estas personas son

seleccionadas mediante pruebas especiales sensoriales de reconocimiento, clasificación y calificación de diversos olores y sabores. Y luego son capacitadas sobre el procesamiento y las características de los granos y la bebida de café.

- **Cereza:** Palabra usada para designar el café maduro antes de ser lavado o secado. Este nombre se debe al parecido que el café en esta condición tiene con la fruta llamada cereza.
- **Conidio:** Espora asexual externa de los hongos.
- **Conidióforo:** Rama del micelio que produce conidios.
- **Desmucilaginado:** Desprendimiento del mucílago o baba del grano de café despulpado.
- **Estibar:** Apretar, recalcar los sacos de café y distribuir su peso en los buques.
- **Fermentación:** Este proceso se realiza en tanques de fermentación y permite retirar el mucílago o mesocarpio. Su duración puede ser entre 12 y 18 horas.
- **Hifa:** Filamento del micelio.
- **In situ:** En el mismo lugar donde se encuentra.
- **Inhibición:** Prevención del crecimiento o multiplicación de los microbios.
- **Mezcla Blend:** Corresponde a una mezcla de varias clases de café verde y a las condiciones del proceso a las que estas serán sometidas para obtener una bebida equilibrada en cuerpo, aroma y acidez.
- **Micotoxina:** Metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, causa enfermedad o muerte de animales o personas.
- **Micromicetos:** Hongos filamentosos con estructuras microscópicas.
- **Microorganismo:** Organismo cuyas dimensiones se miden en micrómetros.
- **Micelio:** Estructura somática filamentosa de un hongo.

- **Moho:** Hongo caracterizado por su estructura filamentososa.
- **Mucílago:** Se genera en la etapa del desmucilaginado, representa en base húmeda, alrededor de 14,85% del peso del fruto fresco. Por cada millón de sacos de 60 kg de café almendra que Colombia exporta, se generan aproximadamente 55.500 toneladas de mucílago fresco, el cual si no se utiliza adecuadamente produciría una contaminación
- **Mutagénico:** Es un agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural.
- **Pergamino:** Recibe esta designación el café tal como sale de las manos del productor.
- **Trilla:** Proceso en el cual al café pergamino seco se le extrae por medio de máquinas especializadas, la película o endocarpio que lo cubre, convirtiéndolo en café verde, para después clasificarlo según tamaño y calidad del grano.
- **Tueste:** Proceso que se le da al café en verde para desarrollar todas sus características de aroma y sabor. Existen varios tipos de tueste de menor a mayor temperatura final, tueste ligero o rubio, tueste medio o de hábito de monje, color marrón y tueste oscuro que enmascara las características de un mal café y es de color marrón oscuro/negruzco.

**ANEXOS**

## ANEXO N° 1

**Cuadro No. 35** Ficha técnica para caracterización de lotes de café.

 UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS "FICHA TÉCNICA PARA CARACTERIZACIÓN DE LOTES DE CAFÉ". 	
No. De Lote:	
Tipo de grano:	
Descripción física del grano:	
Variedad:	
Origen geográfico:	
Origen botánico:	
Procedencia o lugar de producción:	
Sistema de cultivo: <i>(cafetales a libre exposición)</i>	
Fechas de producción:	
Vida Útil del grano de café.	
Descripción del proceso de recolección:	
Descripción del proceso de clasificación: <i>(manual, mecánica, óptica)</i>	
Descripción de las condiciones del cuarto donde se almacenamiento el grano:	
% de Humedad del grano al momento de la verificación:	_____ %
Defectos identificados del grano de café:	
Riesgos biológicos a los que se expuso el grano:	
Identificación de riesgos químicos a los que se expuso el grano:	
Temperatura en el día de muestreo	_____ °C
Humedad relativa del ambiente	_____ %
Circulación del aire entre el techo y la pared	<input type="checkbox"/> Posee <input type="checkbox"/> No posee
Circulación del aire entre el suelo y la piña (referido a	<input type="checkbox"/> Posee

las cantidades de sacos apiñados)	<input type="checkbox"/> No posee
Cantidad de sacos apiñados por lote (cantidad de sacos que se encontró al momento de la toma de muestra)	No. De sacos
Control de roedores (Existencia de trampas: si/no)	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Muestra del grano de café recolectado:	

## ANEXO N° 2

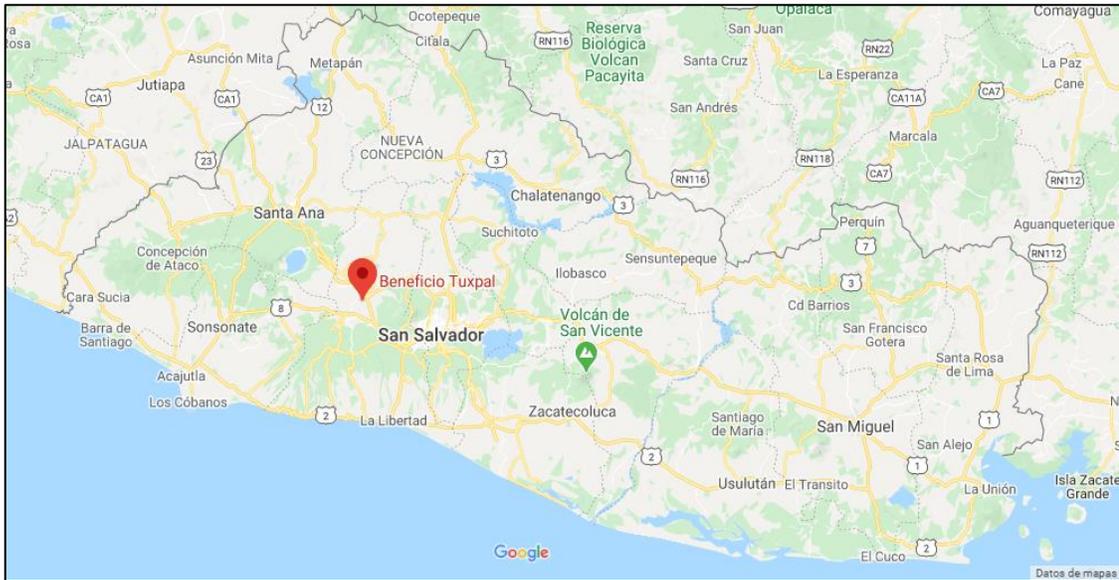


Figura No. 9 Mapa de ubicación del beneficio Tuxpal.

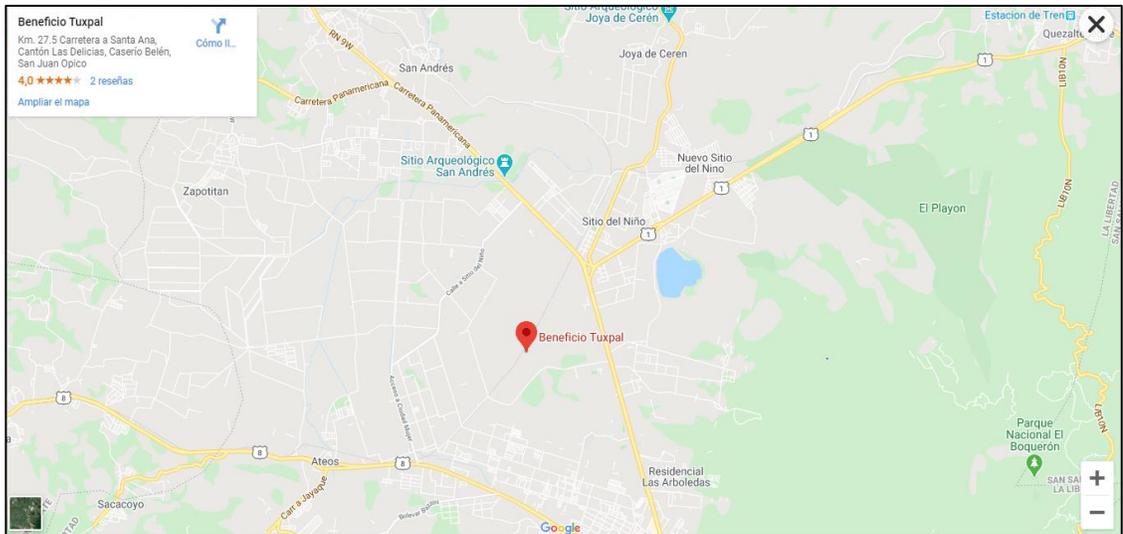


Figura No. 10 Ubicación geográfica del beneficio Tuxpal.

## ANEXO N° 3

### Cuadro No. 36 Procedimiento para recolección de muestras de café.

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS “PROTOCOLO PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE CAFÉ”.	
<p><b>Objetivo:</b> Establecer la metodología para la realización del muestreo de granos de café oro y pergamino contenido en sacos.</p> <p><b>Campo de Aplicación:</b> Este procedimiento aplica para la recolección de toda muestra de café oro y pergamino destinada para:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>-Aplicación de métodos de protección (levadura probiótica)</li><li>-Determinación del porcentaje de humedad</li><li>-Análisis para la cuantificación de hongos y levaduras</li><li>-Cuantificación de la concentración de Ocratoxina A.</li></ul> <p><b>Referencias Normativas:</b> ISO 4072:1982 y NMX-F-107-SCFI-2008</p> <p><b>Definiciones:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-<b>Lote:</b> Cantidad de café verde compuesto de no menos de 10 sacos del mismo tipo con el mismo nombre, rótulo o clave y la misma masa, el cual debe contener café oro/ café pergamino que se asuma tenga propiedades comunes y características razonablemente uniformes para el cuál se puede aplicar un esquema de examen.</li><li>-<b>Saco:</b> Unidad de empaque de 69 kilogramos (peso neto).</li><li>-<b>Sacos dañados:</b> Aquellos sacos que se encuentren rasgados, manchados, sucios, húmedos o presenten algún tipo de contaminación que indique un posible daño del café contenido en ellos.</li><li>-<b>Muestra:</b> Una parte representativa de un lote con base en el cual se estiman las propiedades de dicho lote.</li><li>-<b>Muestra primaria:</b> La cantidad de 30 + 6 g de granos de café oro/café pergamino de un solo saco o de un lote específico.</li></ul> <p><b>Método de muestreo:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-<b>Muestreo al azar estratificado:</b> es aquel en que el campo se divide en estratos debido a la presencia que tienen las unidades (granos de café) por un campo especial. En cada estrato</li></ul>		

se toman unidades al azar de tal forma que la muestra total está constituida por elementos de cada estrato.

Para lo cual, de acuerdo con el tamaño de lote encontrado al momento del muestreo, se aplicará el procedimiento para el proceso de recolección de la muestra.

**Equipo de Muestreo:** Muestreador de materias primas de acero inoxidable previamente esterilizado, cuya capacidad oscila entre 60mL y 250mL y tiene una longitud entre 50 cm y 250 cm

**Recipientes para muestras:**

Se utiliza bolsas plásticas estériles grado alimenticio para la colocación de las muestras y para el traslado de estas. Las bolsas plásticas deben contener un sistema de cierre hermético y el material del que se encuentran fabricadas no debe afectar el olor, sabor y composición de las muestras, además deben preservar la humedad original del lote de donde se tomaron.

**Procedimiento de muestreo:**

**-Toma de muestras Primarias:**

El número de sacos seleccionados de un lote con el propósito de tomar muestras primarias de  $30 \pm 6$  g no debe ser de menos de 10 si son 100 sacos en el lote, y no deben ser menos del 10% del total, si son más de 100 sacos en el lote. Las muestras primarias son tomadas al azar de sacos individuales de diferentes lugares en la estiba, utilizando el calador de café. Cada saco debe ser preferentemente muestreado en 3 diferentes puntos para hacer un total de 30g por cada muestra.

Nota:

a) Sacos dañados se deben separar de los demás del lote. Estos se pueden muestrear separadamente y guardar las muestras primarias en forma separada.

b) El calador se debe introducir totalmente en el saco, con el orificio hacia abajo y girarlo  $180^\circ$  antes de retirarlo.

**-Precauciones para el empaque de muestras:** Las muestras destinadas para la determinación del contenido de humedad, o para algún otro ensayo susceptible de ser afectado por una alteración del contenido de humedad, deberán empacarse en recipientes a prueba de humedad, provistos de cierres herméticos. Los recipientes en este caso deberán llenarse completamente con la muestra de café oro/café pergamino y los cierres sellarse para prevenir la pérdida o alteración del contenido. Para el examen de características que no son propensas a ser influidas por una alteración en el contenido de la humedad, las muestras separadas deberán tomarse y colocarse en recipientes apropiados a los cuáles se les permite acceso de aire.

**-Identificación de muestras:**

Las muestras deben ser identificadas y marcadas con la información contenida en la “Ficha Técnica para la Toma de muestras de Café”, la cual deberá ser completada a mano con lapicero azul por el responsable del muestreo.

**-Traslado de muestras al Laboratorio:**

Para el traslado de las muestras hacia el laboratorio de análisis, se colocará el total de muestras recolectadas en contenedores tipo hieleras que sean herméticas y encontrarse limpias y sanitizadas.

**-Precauciones durante el almacenamiento y transporte de muestras:** Las muestras de laboratorio deben ser enviadas al lugar de examen tan pronto como sea posible después de la obtención y, sólo en circunstancias excepcionales no más de 48 horas después de la obtención y preparación de la muestra.

## ANEXO N° 4

**Cuadro No. 37** Etiqueta de identificación de muestras de café oro y pergamino.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS ETIQUETA DE IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE CAFÉ RECOLECTADAS	
Fecha y hora de muestreo:	
Tipo de muestra:	
Cantidad de muestra recolectada:	
No. De muestra:	
Lugar y dirección del sitio de muestreo:	
Análisis requerido:	
Condiciones de almacenamiento de la muestra recolectada:	
Observaciones:	
Nombre y firma del recolector:	

## ANEXO N° 5

**Cuadro No. 38** Ficha Técnica para toma de datos al momento del muestreo.

 <div style="text-align: center;">           UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR            FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA            MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS            “FICHA TÉCNICA PARA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE CAFÉ”.         </div> 	
No. De Muestra:	
Fecha y hora de recolección:	
Etapa de recolección:	
Tipo de grano de café:	
Variedad/ Origen:	
No. De Lote:	
Beneficio:	
Posee Certificación: <i>(detallar el tipo de certificación que posee)</i>	
Cantidad de muestra recolectada:	
Fecha de ingreso al beneficio:	
Descripción de la muestra recolectada:	
% de humedad del grano:	
Condiciones de almacenamiento: <i>(Condiciones identificadas al momento de la toma de muestra) (temperatura y humedad del cuarto de almacenamiento)</i>	
Condiciones de transporte: <i>(Detalle las condiciones de transporte de la muestra desde el beneficio hasta llegar al laboratorio)</i>	
Observaciones:	
Nombre y Firma de quien recolecto la muestra.	

## ANEXO N° 6

**Cuadro No. 39** Cantidad de muestras a recolectar y su distribución por tiempo de análisis y tratamiento de aplicación.

Tratamiento aplicar	Muestra (área de recolección)	Tiempo de análisis (días)	Determinación	Cantidad de muestra por determinación	Cantidad Total.
Levadura probiótica ( <i>Saccharomyces boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por 15 min)	Café Oro (Almacenamiento de tostaduría)	0 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 1)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
Levadura probiótica ( <i>Saccharomyces boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por 15 min)	Café Pergamino (Almacenamiento de beneficio)	0 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 2)</b>
No Aplica	Muestra control de café pergamino (Almacenamiento	0 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 3)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de	

Tratamiento aplicar	Muestra (área de recolección)	Tiempo de análisis (días)	Determinación	Cantidad de muestra por determinación	Cantidad Total.
	de beneficio)			RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
No Aplica	Muestra control de café oro (Almacenamiento de tostaduría)	0 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 4)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
Levadura probiótica ( <i>Saccharomyces boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por 15 min)	Café Pergamino (Almacenamiento de beneficio)	15 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 5)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
Levadura probiótica ( <i>Saccharomyces boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por	Café Oro (Almacenamiento de tostaduría)	15 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 6)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	

Tratamiento aplicar	Muestra (área de recolección)	Tiempo de análisis (días)	Determinación	Cantidad de muestra por determinación	Cantidad Total.
15 min)					
No Aplica	Muestra control de café pergamino (Almacenamiento de beneficio)	15 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 7)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
No Aplica	Muestra control de café oro (Almacenamiento de tostaduría)	15 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 8)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
Levadura probiótica ( <i>Saccharomyces boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por 15 min)	Café Pergamino (Almacenamiento de beneficio)	56 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 9)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
Levadura	Café Oro	56 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos</b>

Tratamiento aplicar	Muestra (área de recolección)	Tiempo de análisis (días)	Determinación	Cantidad de muestra por determinación	Cantidad Total.
probiótica ( <i>Saccharomyces boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por 15 min)	(Almacenamiento de tostadura)		Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	<b>(Muestra 10)</b>
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
No Aplica	Muestra control de café pergamino (Almacenamiento de beneficio)	56 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 11)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
No Aplica	Muestra control de café oro (Almacenamiento de tostadura)	56 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 12)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
Levadura probiótica ( <i>Saccharomyces</i>	Café Pergamino (Almacenamiento de beneficio)	60 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 13)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores	Muestra de hongos	

Tratamiento aplicar	Muestra (área de recolección)	Tiempo de análisis (días)	Determinación	Cantidad de muestra por determinación	Cantidad Total.
<i>boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por 15 min)			de ocratoxina A.	de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
Levadura probiótica ( <i>Saccharomyces boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por 15 min)	Café Oro (Almacenamiento de tostadería)	60 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 14)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
No Aplica	Muestra control de café pergamino (Almacenamiento de beneficio)	60 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 15)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
No Aplica	Muestra control de café oro (Almacenamiento de tostadería)	60 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 16)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de	

Tratamiento aplicar	Muestra (área de recolección)	Tiempo de análisis (días)	Determinación	Cantidad de muestra por determinación	Cantidad Total.
				RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
Levadura probiótica ( <i>Saccharomyces boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por 15 min)	Café Pergamino (Almacenamiento de beneficio)	90 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 17)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
Levadura probiótica ( <i>Saccharomyces boulardii</i> 10 <sup>8</sup> células de levadura/mL por 15 min)	Café Oro (Almacenamiento de tostadura)	90 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 18)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
No Aplica	Muestra control de café pergamino (Almacenamiento de beneficio)	90 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 19)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	

Tratamiento aplicar	Muestra (área de recolección)	Tiempo de análisis (días)	Determinación	Cantidad de muestra por determinación	Cantidad Total.
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
No Aplica	Muestra control de café oro (Almacenamiento de tostaduría)	90 días	Porcentaje de Humedad.	10.0 gramos	<b>30 gramos (Muestra 20)</b>
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	
			Recuento total de hongos y levaduras.	10.0 gramos	
			Identificación de hongos productores de ocratoxina A.	Muestra de hongos de la prueba de RTHL.	
			-Cuantificación de ocratoxina A.	10.0 gramos	

## ANEXO N° 7



1. Tomar una cantidad de polvo liofilizado de *S. boulardii*, equivalente a  $10^{10}$  células de levadura.



2. Pesar 2.0 g de polvo liofilizado y proceder a la reconstitución.



3. Adicionar 100 mL de agua estéril a temperatura ambiente.



6. Homogeneizar a temperatura ambiente durante 5 min.



5. Detener la agitación y dejar reposar durante 20 minutos, a una temperatura de 25 –30°C



4. Homogeneizar delicadamente con la ayuda de un agitador magnético a 100rpm por 5 min.



7. Extraer en forma estéril y realizar los controles microbiológicos respectivos.

**Figura No. 11** Reconstitución de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*.<sup>(18)</sup>

## ANEXO N° 8



1. Extraer 1 mL del líquido reconstituido de *Saccharomyces boulardii* equivalente a 10<sup>9</sup> células de levadura/ml.

2. Colocar en un tubo de ensayo que contiene 10 mL de solución salina estéril y agitarlo.

3. Adicionar 1000 µL de solución de *Saccharomyces boulardii* a una celda de espectrofotómetro.



6. De la levadura estandarizada tomar una alícuota de 1.0mL e inocular en placas adicionando Agar Sabouraud (4% de glucosa) para el mantenimiento de la cepa.

5. Realizar diluciones para obtener una concentración de 10<sup>8</sup> células de levadura/mL, considerando que la absorbancia entre 0.3-0.4 es equivalente a 0.8x10<sup>8</sup>-1.5x10<sup>8</sup> células de levadura/mL.

4. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620nm.

**Figura No. 12** Estandarización de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, mediante el método espectrofotométrico. <sup>(18)</sup>

## ANEXO N° 9



1. Pesar una muestra de granos de café oro/ café pergamino equivalente a 30 g.



2. Aplicar 10mL de levadura probiótica ( $10^8$  células de levadura/mL) a 30 g de café oro/café pergamino, sumergidos en 1000 mL de agua purificada.



3. Tomar un cronometro digital y coloque un tiempo de 15 minutos.



6. Resguardar los granos de café oro/café pergamino en bolsas plásticas estériles, para proceder con las determinaciones pertinentes.



5. Dejar secar los granos de café oro/café pergamino al ambiente en patios de secado hasta que el grano tenga una humedad del 12%.



4. Retire los granos de café oro/café pergamino y extiéndalos sobre bandejas de vidrio o aluminio.

**Figura No. 13** Aplicación de levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* en muestras de café oro y café pergamino. (11, 18, 25)

## ANEXO N° 10



1. Pesar una muestra de granos de café oro/café pergamino, equivalente a 10 g.



2. Programar los parámetros de la medición y el perfil del secado especificando la temperatura de secado a 100°C por 10 minutos y colocando los resultados en % de humedad.



3. colocar la muestra en el platillo para realizar la determinación de la humedad del grano de café oro/granos de café pergamino.



4. Anotar los resultados para cada día de análisis

**Figura No. 14** Determinación del porcentaje de húmeda para granos de café oro y café pergamino.

## ANEXO N° 11



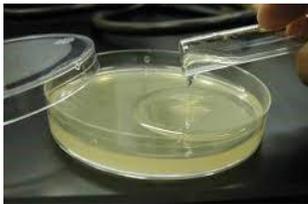
1. Pesar 39.0 g del polvo de Agar Papa Dextrosa.



2. Disuelva los 39.0 g del agar en 1000ml de agua purificada/destilada y caliente a ebullición para disolver por completo.



3. Esterilizar por autoclave a una presión de 15 libras (121 ° C) durante 15 minutos.



6. Mezclar bien antes de dispensar



5. Mida el pH con cinta medidora de pH o con pH metro, el cual debe encontrarse a 3.5 para evitar el crecimiento de bacterias.



4. adicione 1.0mL de ácido tartárico al 10%, para disminuir el pH.

**Figura No. 15** Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

## ANEXO N° 12



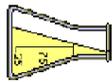
1. Pesar en una balanza semianalitica 10g de café oro/café pergamino.



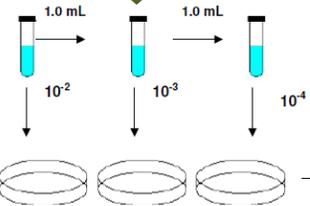
2. Estomachear 10.0g de muestra de café oro/café pergamino a 260 rpm por 1 minuto, con 90.0mL de agua peptonada estéril, para obtener la dilución  $10^{-1}$ .



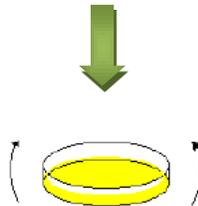
3. Proceda hacer diluciones seriadas 1:10 hasta obtener la dilución  $10^{-4}$ .



5. Adicionar de 15-20mL de agar papa dextrosa, enfriado a  $45^{\circ}\text{C}$ , en cada una de las placas de Petri.



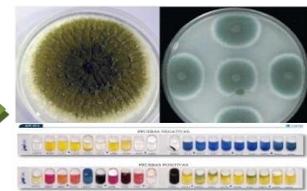
4. Inocular por duplicado 1.0mL de las diluciones preparadas en placas de Petri.



6. Homogenizar muestra con el agar mediante técnica del 8.



7. Incubar las placas de 3-5 días a temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$



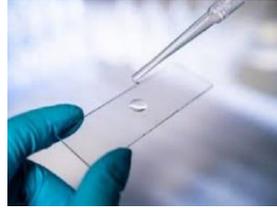
8. Contar las placas que tengan colonias de hongos y realice las pruebas de identificación con un kit de pruebas rápidas Api.

**Figura No. 16** Cuantificación de hongos productores de ocratoxina A, en muestras de granos de café oro y café pergamino <sup>(13)</sup>

## ANEXO N° 13



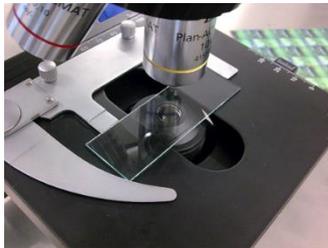
1. Preparar una tinción al fresco del crecimiento fúngico a partir de las placas de Petri que mostraron crecimiento.



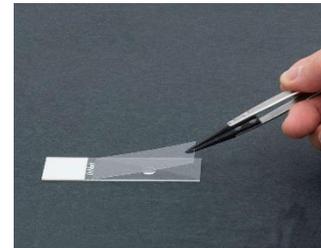
2. Colocado una gota de solución salina estéril en la lámina porta muestra.



3. Colocar una muestra de crecimiento fúngico con un asa de platino estéril en la lámina porta muestra.



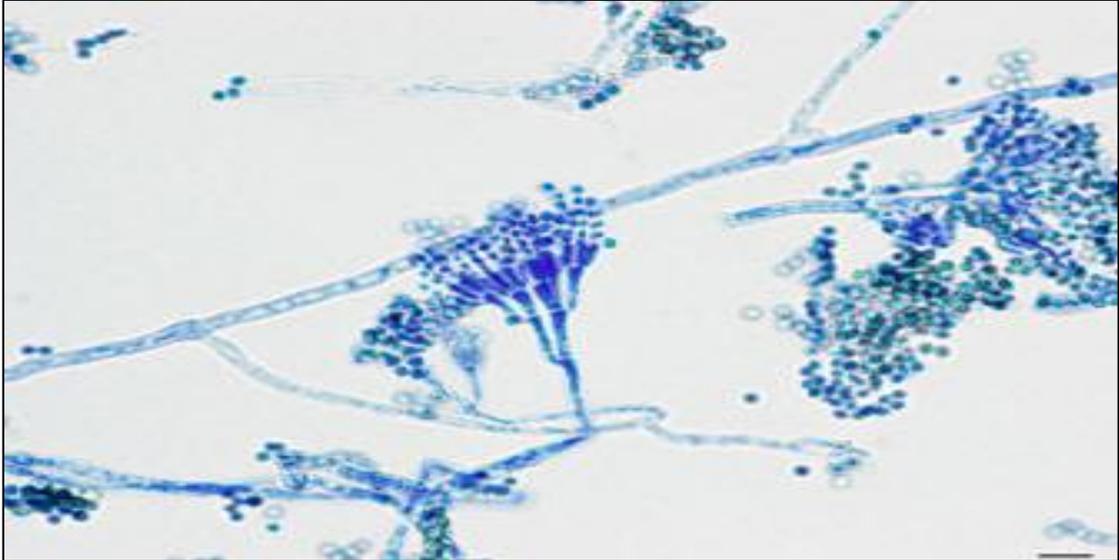
5. Coloque la lámina con la muestra al microscopio e identifique la morfología fúngica.



4. Cuidadosamente coloque una lámina cubreobjetos y luego rotule para su identificación.

**Figura No. 17** Identificación de hongos productores de ocratoxina mediante tinción al fresco.

**ANEXO N° 14**



**Figura No. 18** *Penicillium sp* visto al microscopio.



**Figura No. 19** *Aspergillus sp* visto al microscopio.

## ANEXO N° 15



1. Preparé las muestras de análisis mediante el molido de los granos de café oro/café pergamino con un molino de cuchillas hasta la obtención de un polvo



2. Tamice las muestras utilizando un tamiz de 20 micras.



3. Pesar una cantidad equivalente a 20 g de polvo de muestra tamizado.



6. Filtrar las muestras hasta obtener una solución líquida y transparente.



5. Agitar vigorosamente cada una de las muestras por 3 minutos.



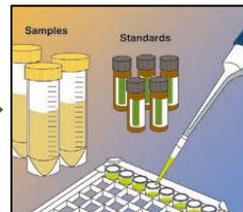
4. Adicione 30mL de metanol al 70 a cada una de las muestras.



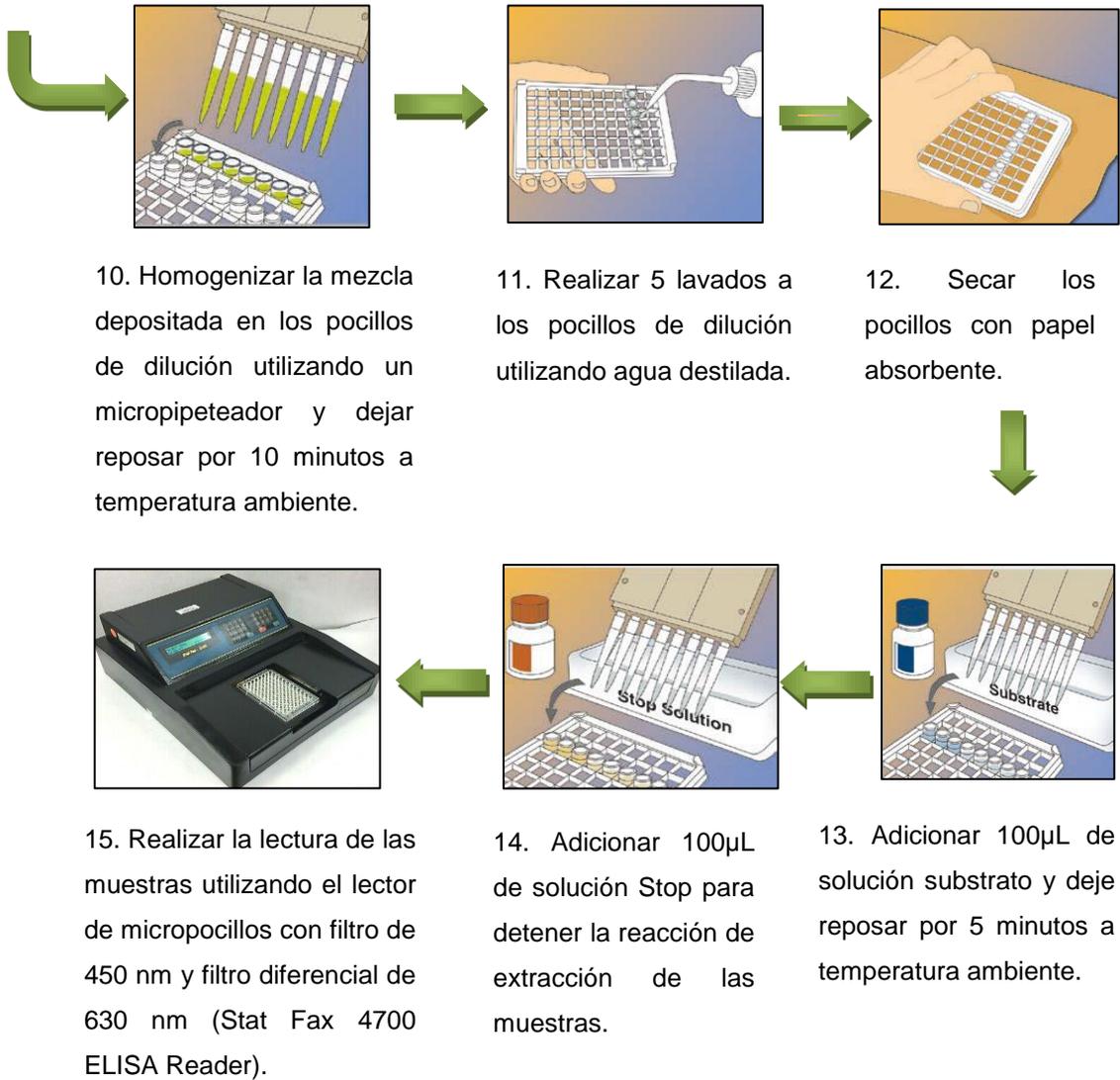
7. Verifique el pH de cada muestra el cual debe encontrarse entre 6-8.



8. Adicionar 200µL de solución conjugada y colóquela dentro de los pocillos de dilución.



9. Adicione a los micropocillos, 100µL de la solución muestra de granos de café oro/café pergamino.



**Figura No. 20** Flujograma para la determinación de Ocratoxina A en granos de café oro y café pergamino utilizando el kit AgraQuant® ELISA. (4,

## ANEXO N° 16

### Cuadro No. 40 Protocolo para la catación del café como producto terminado.

	<p>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS “PROTOCOLO PARA LA CATACIÓN DE CAFÉ COMO PRODUCTO TERMINADO”.</p>	
<p><b>Objetivo:</b> Realizar la evaluación sensorial del café e identificar y definir las características intrínsecas dadas por el origen: especie y variedad, ubicación geográfica, clima y suelo. Además, comprobar si dichas características se mantuvieron inalterables o sufrieron cambios por la aplicación de la levadura probiótica.</p>		
<p><b>Materiales:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Una mesa para la cata</li><li>- Una silla por catador</li><li>- Una escupidera por catador</li><li>- Vaso con agua potable</li><li>- Termómetro</li><li>- Bandejas de aluminio para colocar las muestras</li><li>- Tazas de porcelana con capacidad de 180 a 200 ml</li><li>- Cuchara</li><li>- Prensa Francesa</li><li>- Recipientes para calentar el agua.</li><li>- Tostador de muestras</li><li>- Molino de café</li><li>- Balanza semianalítica</li><li>- Etiquetas para identificación de las muestras</li><li>- Lápiz e impresos para anotación de los resultados de la clasificación</li></ul>		
<p><b>Preparación de la muestra</b></p> <p><b>1. Tueste:</b></p> <p>-La muestra deberá ser tostada dentro de las 24 horas antes de la cata y con un reposo mínimo de 8 horas.</p> <p>-El punto de tueste deberá ser claro a claro-medio tueste, medido según la escala del M-Basic (Gourmet) Agrtron de aproximadamente 58 en el grano entero y 63 en grano molido, +/- 1 punto. El tueste deberá completarse en no menos de 8 minutos y no más de 12.</p>		

-La muestra deberá ser enfriada inmediatamente con aire frío. Cuando alcance la temperatura ambiente de aproximadamente 20° C, se almacenará en recipientes herméticos o en bolsas impermeables hasta el momento de la cata para minimizar la exposición al aire y evitar contaminaciones. El almacenamiento debe ser en un lugar oscuro y fresco.

## **2. Dosis:**

La dosis óptima para la catación es 8.25 gramos para 150 ml de agua.

## **3.Preparacion de la Cata:**

-La muestra deberá molerse inmediatamente antes de la cata, no más de 15 minutos antes de la infusión con agua. Antes de moler y para determinar la dosis, la muestra deberá ser pesada, inexcusablemente, con los granos enteros.

-El tamaño de las partículas molidas deberá ser ligeramente irregular como el habitualmente utilizado para las cafeteras de filtro.

-Cada taza deberá ser molida encaminando la cantidad precisa de la muestra a través del molino, de manera que cada una de ellas se molerá independientemente, asegurándose de que todo el café de cada taza quedó depositado en la taza. Inmediatamente después de moler, deberá ser colocada en cada taza.

## **4. Vertido del Agua:**

-El agua utilizada para la cata debe estar limpia y libre de olores, pero no deberá ser destilada o suavizada. Además, debe ser fresca y debe encontrarse a una temperatura de hasta aproximadamente 93° C en el momento de llenar la taza.

-El agua caliente deberá ser vertida hasta el borde de la taza y directamente sobre la dosis de café molido.

-Se permite que el café molido permanezca sin interferencias de 3 a 5 minutos antes de ser evaluado.

## **Evaluación de la muestra**

### **1.Aroma:**

-Dentro de los 15 minutos después de que las muestras hayan sido molidas, su aroma deberá ser evaluado levantando la tapa y oliendo el café en seco.

-Después de la infusión con agua, la corteza permanecerá sin romperse por lo menos 3 minutos, pero no más de 5. La rotura de la corteza es realizada moviendo la taza 3 veces, permitiendo entonces al vapor que acompañe a la parte posterior de la cuchara mientras olemos suavemente.

-La puntuación del aroma se determina basándose en la evaluación seca y húmeda.

### **2.Sabor, post-gusto, acidez, cuerpo y equilibrio:**

-Cuando la muestra ha enfriado a 70° C, después de 8-10 minutos desde la infusión, la

evaluación del café debe comenzar.

-El café es aspirado dentro de la boca de tal manera que alcance la mayor área posible, especialmente la lengua y el paladar.

-Los vapores retronasales alcanzan su máxima intensidad a estas elevadas temperaturas, por lo que sabor y regusto son evaluados en este punto. Como el café continúa enfriándose, la acidez, cuerpo y equilibrio son evaluados a continuación.

-El equilibrio es la opinión del catador de cómo el sabor, gusto, acidez, y cuerpo se unen en una combinación sinérgica. Las preferencias del catador acerca de los diferentes atributos son evaluadas a varias temperaturas diferentes (2 o 3 veces) mientras la muestra enfría.

-Para evaluar la muestra en una escala de 16 puntos, rodea la marca apropiada en el formulario de cata. Si se hace algún cambio (si la muestra gana o perdiese alguna de sus características de calidad debido al cambio de temperatura), se remarca la escala horizontal y se dibuja un punto para indicar la dirección de la puntuación final.

### **3. Dulzor y uniformidad:**

-Cuando el café alcanza la temperatura ambiente, dulzor y uniformidad serán evaluadas.

-Para estos atributos, el catador juzgará cada una de las tazas individualmente, adjudicando 2 puntos por taza y por atributo.

-La evaluación del café deberá cesar cuando la muestra alcance 16° C. La puntuación conjunta es determinada por el catador dando a la muestra como "Puntos del Catador" basados en la combinación de todos los atributos.

## ANEXO N° 17

**Tabla No. 5** Materiales a utilizar para la medición de humedad en granos de café.

Medición de humedad en granos de café.			
Descripción	Cantidad para utilizar por un análisis	Cantidad por total de muestras a procesar	Observaciones
<b>Materiales:</b>			
Granos de café oro	10.0 gramos	180 gramos	N/A
Granos de café pergamino	10.0 gramos	180 gramos	N/A
<b>Equipos:</b>			
balanza de humedad Ohaus MB45	1	1	N/A
<b>Otros:</b>			
Cuaderno para anotaciones	1	N/A	N/A

**Tabla No. 6** Materiales a utilizar para la determinación e identificación de hongos productores de ocratoxina A, en granos de café.

Determinación e identificación de hongos productores de Ocratoxina A, en granos de café.			
Descripción	Cantidad para utilizar por un análisis	Cantidad por total de muestras a procesar	Observaciones
<b>Materiales:</b>			
Granos de café oro	10.0 gramos	180 gramos	N/A
Granos de café pergamino	10.0 gramos	180 gramos	N/A
<b>Medios de Cultivo:</b>			
Agua Peptonada Estéril	90.0mL	1620mL	N/A
Tubos de ensayo estériles con agua 9.0mL de APE	27.0 mL de APE (3 tubos de ensayo)	486 mL	N/A

15ml de Agar Papa dextrosa para placas de Petri (6 placas)	90.0 ml	1620mL	N/A
<b>Reactivos:</b>			
Reactivos para pruebas rápidas API	Según crecimiento.	Según crecimiento.	N/A
Ácido Tartárico al 10%	1.0 mL	18.0 mL	Adicionar al agar Papa dextrosa para tener un pH 3.5
<b>Equipos:</b>			
Balanza semi-analítica	1	1	N/A
Stomacher	1	1	260 rpm durante 1 min
Incubadora	1	1	Temperatura de uso: 25 ± 2°C
Contador de colonias	1	1	N/A
<b>Otros:</b>			
Bolsas estériles para Stomacher	1 bolsa	18 bolsas	N/A
Pipetas de 1.0 mL	4 pipetas	72 pipetas	Pipetas estériles
Placas de Petri	6 placas	108 placas	Placas estériles
Kit de pruebas rápidas API	Según crecimiento.	Según crecimiento.	Para hongos ocratoxigenicos

**Tabla No. 7** Materiales a utilizar para el recuento de Ocratoxinas.

Recuento de ocratoxinas.			
Descripción	Cantidad para utilizar por un análisis	Cantidad por total de muestras a procesar	Observaciones
<b>Materiales:</b>			
Granos de café oro	10.0 gramos	180 gramos	N/A
Granos de café pergamino	10.0 gramos	180 gramos	N/A

<b>Reactivos</b>			
Metanol al 70%	40mL	720mL	N/A
Reactivos del kit Accu Scan	1	1	N/A
<b>Equipos:</b>			
Molino o mortero y pistilo.	1	1	N/A
Cronometro	1	1	N/A
Balanza sami analítica	1	1	N/A
Equipo Accu Scan	1	1	N/A
<b>Otros:</b>			
Beaker de 100.0 mL	1	1	N/A
Papel toalla	1	1	N/A
Tubos de dilución	4 tubos	72 tubos	N/A
Gradilla	1	1	N/A
Jeringa o micropipeta	3 jeringas	54 jeringas	N/A

**Tabla No. 8** Materiales a utilizar para la reconstitución de Levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*.

Reconstitución de Levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> .			
Descripción	Cantidad para utilizar por un análisis	Cantidad por total de muestras a procesar	Observaciones
<b>Materiales:</b>			
Polvo liofilizado de <i>S. boulardii</i> equivalente a $10^{10}$ células	2.0 gramos	36 gramos	N/A
<b>Reactivos</b>			
Agua destilada	100mL	1800mL	N/A
<b>Equipos:</b>			
Balanza analítica	1	1	N/A

Agitador Magnético	1	1	N/A
Cronometro	1	1	N/A
Termómetro de vidrio	1	1	N/A
<b>Otros:</b>			
Porta muestra o papel glas	1	1	N/A
Erlenmeyer de 100.0mL	1	1	N/A
Probeta graduada de 100.0 mL	1	1	N/A
Agitador de vidrio	1	1	N/A

**Tabla No. 9** Materiales a utilizar para la estandarización de Levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*.

Estandarización de Levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> , mediante el Método Espectrofotométrico.			
Descripción	Cantidad para utilizar por un análisis	Cantidad por total de muestras a procesar	Observaciones
<b>Materiales:</b>			
<i>S. boulardii</i> reconstituida.	1.0mL	18.0mL	N/A
<b>Medios de Cultivo:</b>			
Placas de Petri con 10-15mL de agar Sabouraud	2 placas (20-30 mL de agar Sabouraud)	36 placas (720mL aprox.)	Para el mantenimiento de cepa
<b>Equipos:</b>			
Micropipeta	1	1	N/A
Espectrofotómetro	1	1	620nm
<b>Otros:</b>			
Erlenmeyer de 50.0mL estéril	1	1	N/A
Puntas estériles para micro pipeta	10	180	Dato aproximado.
Tubos de ensayo con 10mL de SS.	10 tubos (100mL de SS)	180 tubos (1800 mL de SS)	Dato aproximado.
Celdas de cuarzo o plásticas.	2	2	N/A

Pipeta de 1 mL	2	36	N/A
Pipeteador.	1	1	N/A

**Tabla No. 10** Materiales a utilizar para la aplicación de Levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*.

Aplicación de Levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> .			
Descripción	Cantidad para utilizar por un análisis	Cantidad por total de muestras a procesar	Observaciones
<b>Materiales:</b>			
Granos de café oro	30.0 gramos	360 gramos	N/A
Granos de café pergamino	30.0 gramos	360 gramos	N/A
<b>Equipos:</b>			
Cronometro	1	1	N/A
<b>Otros:</b>			
Pipeta de 1.0mL	1	18	N/A
Pipeteador	1	1	N/A
Agua destilada	100mL	1800mL	N/A
Bandeja plástica	3	3	N/A



## Technical Data

### Potato Dextrose Agar

M096

#### Intended use

Potato Dextrose Agar is recommended for the isolation and enumeration of yeasts and molds from water, dairy, other food products and clinical samples.

#### Composition\*\*

Ingredients	Gms / Litre
Potatoes, infusion from	100.000
Dextrose	20.000
Agar	15.000
Final pH ( at 25°C)	5.6±0.2

\*\*Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

#### Directions

Suspend 39.0 grams in 1000 ml purified/ distilled water. Heat to boiling to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes. Mix well before dispensing. In specific work, when pH 3.5 is required, acidify the medium with sterile 10% tartaric acid. The amount of acid required for 100 ml of sterile, cooled medium is approximately 1 ml. DO NOT HEAT the medium after addition of the acid.

#### Principle And Interpretation

Potato Dextrose Agar is recommended by APCA (9) and F.D.A. (4) for plate counts of yeasts and molds in the enumeration of foods and dairy products (3). Potato Dextrose Agar is also used for stimulating sporulation, for maintaining stock cultures of certain dermatophytes and for differentiation of typical varieties of dermatophytes on the basis of pigment production (8). It is also recommended by USP (10), BP (2), EP (3) and JP (6) for growth of fungi.

Potato infusion and dextrose promote luxuriant fungal growth. Adjusting the pH of the medium by tartaric acid to 3.5, inhibits the bacterial growth. Heating the medium after acidification should be avoided as it may hydrolyse the agar which can render the agar unable to solidify.

#### Type of specimen

Food and dairy samples, Water samples, Clinical samples- skin scrapings

#### Specimen Collection and Handling:

For clinical samples follow appropriate techniques for handling specimens as per established guidelines (5,7).

For food and dairy samples, follow appropriate techniques for sample collection and processing as per guidelines (4,9,11).

For water samples, follow appropriate techniques for sample collection, processing as per guidelines and local standards.(1)

After use, contaminated materials must be sterilized by autoclaving before discarding.

#### Warning and Precautions

**In Vitro diagnostic Use.** Read the label before opening the container. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/ face protection. Follow good microbiological lab practices while handling specimens and culture. Standard precautions as per established guidelines should be followed while handling clinical specimens. Safety guidelines may be referred in individual safety data sheets

#### Limitations :

1. Heating the medium after acidification should be avoided as it may hydrolyse the agar which can render the agar unable to solidify.

#### Performance and Evaluation

Performance of the medium is expected when used as per the direction on the label within the expiry period when stored at recommended temperature.

#### Quality Control

##### Appearance

Cream to yellow homogeneous free flowing powder

Please refer disclaimer Overleaf.

**Gelling**

Firm, comparable with 1.5% Agar gel

**Colour and Clarity of prepared medium**

Light amber coloured clear to slightly opalescent gel forms in Petri plates.

**Reaction**

Reaction of 4.1% w/v aqueous solution at 25°C. pH : 5.6±0.2

**pH**

5.40-5.80

**Cultural Response**

Cultural characteristics observed after an incubation at 22 - 25°C for 4 - 5 days .

Organism	Growth	Ascospore formation
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 (00053*)	Incuriant	Negative
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (00054*)	Incuriant	Negative
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 (00056*)	Incuriant	Positive

Key : \* - Corresponding WDCM numbers

**Storage and Shelf Life**

Store between 10-30°C in a tightly closed container and the prepared medium at 20-30°C. Use before expiry date on the label. On opening, product should be properly stored dry, after tightly capping the bottle in order to prevent lump formation due to the hygroscopic nature of the product. Improper storage of the product may lead to lump formation. Store in dry ventilated area protected from extremes of temperature and sources of ignition. Seal the container tightly after use. Use before expiry date on the label.

Product performance is best if used within stated expiry period.

**Disposal**

User must ensure safe disposal by autoclaving and/or incineration of used or unusable preparations of this product. Follow established laboratory procedures in disposing of infectious materials and material that comes into contact with clinical sample must be decontaminated and disposed of in accordance with current laboratory techniques (5,7).

**Reference**

- Baird R.B., Eaton A.D., and Rice E.W., (Eds), 2015, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd ed., APHA, Washington, D.C.
- British Pharmacopoeia, 2017, The Stationery office British Pharmacopoeia
- European Pharmacopoeia, 2017, European Dept. for the quality of Medicines.
- FDA Bacteriological Analytical Manual, 2005, 18th Ed., AOAC, Washington, DC.
- Isenberg, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2<sup>nd</sup> Edition.
- Japanese Pharmacopoeia, 2016.
- Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Carroll, K.C., Funke, G., Landry, M.L., Richter, S.S and Tenover, D.W. (2015) Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. Vol. 1.
- MacFaddin J. E., 1985, Media for the Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore
- Salfinger Y., and Tortorello M.L., 2015, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th Ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- The United States Pharmacopoeia, 2018, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.
- Wehr H. M. and Frank J. H., 2004, Standard Methods for the Microbiological Examination of Dairy Products, 17th Ed., APHA Inc., Washington, D.C.

Revision: 05/2019

Please refer disclaimer Overleaf.

Figura No. 21 Ficha técnica del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa.

MYCOTOXINS  
**AgraQuant®**  
Mycotoxin ELISA Test Kits

Romer Labs® has developed a rapid, quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of mycotoxins in grains, nuts, cereals and other commodities including animal feeds.



**How the test works**

AgraQuant® Mycotoxin products are direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). One universal sample extraction using a 70% methanol solution can be applied to analyze six classes of mycotoxins with eight different kits. Some kits apply a dilution of the sample extract to reduce matrix effects.

After combining sample extract or calibrators and enzyme conjugated toxin in the antibody coated well the competitive reaction takes 10 – 60 min (first incubation). Subsequent washing removes unbound reactants followed by the addition of substrate starting a color reaction that takes 5 – 20 min

(second incubation). The intensity of the color is inversely proportionate to the concentration of mycotoxin in the sample or standard. A stop solution prevents further development of the color reaction enabling reproducible measurements of the intensity using a microwell reader. Results can be interpreted by using Romer Labs spreadsheets.

**Kit contents**

Each kit comes complete with 5 to 6 standards, 48 or 96 antibody-coated microwells, 48 or 96 color-coded dilution microwells, conjugate, substrate and stop solution.

**PRODUCT FEATURES**

**Easy**

- One sample extraction to analyze six mycotoxins
- Simple workflow and no clean up steps required

**Convenient**

- Wide range of validated commodities
- Up to 30 minutes reading time after stopping the reaction

**Cost-effective**

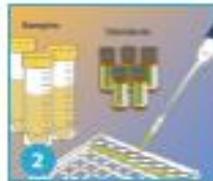
- 48 or 96 breakaway microwell format
- Minimizes waste and maximizes value

# AgraQuant® Mycotoxin ELISA Test

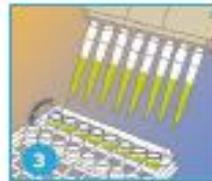
Read the kit insert before running the test.



1 Add 200 µL conjugate into each color-coded dilution well.



2 Add 100 µL standards or samples to the conjugate.



3 Mix well. Transfer 100 µL content to antibody-coated wells. Incubate for 5 - 60 minutes.



4 Discard contents from the wells and wash wells with deionized water or buffer solution (5x).



5 Tap dry the wells on absorbent paper towel.



6 Add 100 µL substrate into each well. Incubate for 5 - 20 minutes.



7 Add 100 µL stop solution into each well.



8 Analyze results using an ELISA reader with 450 nm filter.

## Ordering Information - AgraQuant® Mycotoxin Test Kits

Item No.	Description	Part Number	Quantitation Range
AgraQuant® Total Aflatoxin	96/48 wells	10002096/10002099	4 - 40 ppb
AgraQuant® Total Aflatoxin	96/48 wells	10002100/10002101	1 - 20 ppb
AgraQuant® Aflatoxin M1 Sensitive	96/48 wells	10002116/10002117	25 - 500 ppt
AgraQuant® Aflatoxin M1 Plus	96/48 wells	10002118/10002119	100 - 2000 ppt
AgraQuant® Aflatoxin M1 High Sensitivity	96/48 wells	10002120/10002121	5 - 100 ppt
AgraQuant® Aflatoxin B1	96/48 wells	10002122/10002123	2 - 50 ppb
AgraQuant® Deoxynivalenol	96/48 wells	10002106/10002108	250 - 5000 ppb
AgraQuant® Fumonisin	96/48 wells	10002104/10002105	250 - 5000 ppb
AgraQuant® Ochratoxin	96/48 wells	10002102/10002103	2 - 40 ppb
AgraQuant® T-2 Toxin	96/48 wells	10002113/10002114	20 - 500 ppb
AgraQuant® Zearalenone Plus	96/48 wells	10002111/10002112	25 - 1000 ppb

Romer Labs Inc. - America - Newark, DE, USA - T +1 302 781 6400 - F +1 302 781 6376 - E [office@romerlabs.com](mailto:office@romerlabs.com)  
 Romer Labs Diagnostik GmbH - Europe - Tulln, Austria - T +43 2272 615 33 - F +43 2272 615 33 13177 - E [office-europe@romerlabs.com](mailto:office-europe@romerlabs.com)  
 Romer Labs Singapore Pte. Ltd. - Asia - Singapore - T +65 6631 8018 - F +65 6275 5584 - E [salesasia@romerlabs.com](mailto:salesasia@romerlabs.com)

[www.romerlabs.com](http://www.romerlabs.com)

Romer Labs is part of ERBER Group

© copyright Romer Labs. All rights reserved. 2018

AgraQuant Mycotoxin Test Kit (96 wells) 2018

Figura No. 22 Ficha técnica del kit para la determinación de Ocratoxina.

# ANEXO N° 20



## CERTIFICATE OF PERFORMANCE

### AgraQuant® Total Ochratoxin Test Kit (2 - 40ppb)

Product No.: COKAQ2000/ COKAQ2048; Lot No.: 201201-1817  
 Expiration Date: 1 Dec 2019

Romer Labs® certifies that this batch of test kits has passed quality control assays and conforms with below specifications

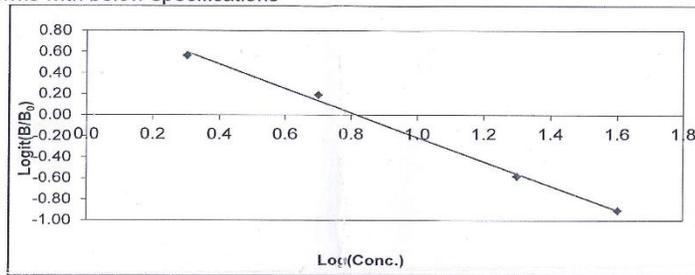


Figure 1. Standard curve of test kit  
 (Correlation coefficient,  $R = -0.9983$ , 50% inhibition = 6.6 ppb)

Sample ID	Number	Mean OD	B/B <sub>0</sub> , %	CV, %
Standard, 0ppb	3	1.887	100	2.7
Standard, 2ppb	3	1.483	79	0.5
Standard, 5ppb	3	1.151	61	1.0
Standard, 20ppb	3	0.393	21	11.2
Standard, 40ppb	3	0.208	11	13.0
Quality Control Sample ID	Number	Ochratoxin Concentration (ppb)	Recovery Percentage (%)	
Non-contaminated corn	3	<2.0	N.A.	
Corn spiked with OTA, 10ppb	3	8.6 ± 0.5	86 ± 5	
Naturally contaminated corn, 18ppb	3	17.1 ± 0.5	95 ± 3	

Note: 1) The OD value for standards may decrease during the shelf life of the test kit. The linearity of the standard curve should remain the same, though the slope of the curve may change slightly.  
 2) Acceptable criteria for calibration curve: OD value for 0ppb ≥ 0.5; correlation coefficient, R must be between -0.990 to -1.000.  
 3) The test kit has shelf-life as indicated in the certificate of performance or labels if it is stored properly, under proper shipping conditions. Improper storage and exposure to high temperature during shipment may affect the kit shelf life.

JW  
 Regional Quality Control Executive

[Signature]  
 Managing Director / Vice President

04/12/2018  
 Date  
 (DD/MM/YYYY)  
04/12/2018  
 Date  
 (DD/MM/YYYY)

Figura No. 23 Certificado del kit para la determinación de Ochratoxina.

**EVALUACIÓN DE *SACCHAROMYCES BOULARDII* EN LA REDUCCIÓN DE COLONIAS DE *PENICILLIUM* Y *ASPERGILLUS* EN GRANOS DE CAFÉ ORO Y PERGAMINO.**

**EVALUATION OF *SACCHAROMYCES BOULARDII* IN THE REDUCTION OF *PENICILLIUM* AND *ASPERGILLUS* COLONIES ON GOLD AND PARCHMENT COFFEE BEANS.**

Erika Yessenia Maldonado López<sup>1</sup>, Karla Iliana Romero de Grande<sup>2</sup>, Andrés Wilfredo Rivas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos. [er.maldonado.ml@gmail.com](mailto:er.maldonado.ml@gmail.com) <http://orcid.org/0000-0002-4570-6520>

<sup>2</sup> Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos. [karla241986@gmail.com](mailto:karla241986@gmail.com) <http://orcid.org/0000-0002-5168-302X>

<sup>3</sup> Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. [awrivasf@gmail.com](mailto:awrivasf@gmail.com) <http://orcid.org/0000-0001-8377-3428>

**RESUMEN**

La Ocratoxina A es tan peligrosa, que expertos de la FAO y OMS (2009) han establecido un límite máximo tolerable para los humanos de 100 milmillonésimos de gramo por kilogramo de peso corporal a la semana, asimismo la Unión Europea (2006), estableció límites máximos admisibles para la Ocratoxina A de 5 ppb en el café tostado y molido y 10 ppb en el café instantáneo. El café producido localmente, así como el café obtenido de las importaciones no cuenta con registros que aseguren que el café para consumo local esté libre de microorganismos que perjudiquen la salud humana. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de la *Saccharomyces boulardii* en la reducción de colonias de *Penicillium* y *Aspergillus* en granos de café oro y pergamino recolectadas en cuartos de almacenamiento de una exportadora de café, durante el periodo de septiembre de 2019 a noviembre de 2020. Se aplicó la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* a la concentración de  $10^8$  células de levadura/mL por 15 minutos a las muestras de granos de café pergamino y oro, los cuales se caracterizaron con el uso de una ficha técnica que permitió recabar datos relacionados a las condiciones de almacenamiento. La parte experimental se realizó con un diseño completamente al azar con arreglo factorial y con una repetición; las muestras y controles fueron resguardados a condiciones de temperatura ambiente; las muestras fueron extraídas durante los días 0, 15, 56, 60 y 90 días, realizando las determinaciones correspondientes a porcentaje de humedad, recuento total de mohos y levaduras, identificación de hongos ocratoxigénicos y cuantificación de ocratoxina A. Se evidenció al día 15 de evaluación el grado de protección que *Saccharomyces boulardii* tiene sobre los granos de café en condiciones de temperatura ambiente. Asimismo, se realizó un análisis costo efectividad para determinar el tratamiento con mayor efectividad, seleccionando el índice C/E igual al valor cero o el valor más bajo, aceptando los tratamientos 1 y 2 al día 15 del análisis.

**PALABRAS CLAVE:** Ocratoxina A, *Saccharomyces boulardii*, carcinógeno, levadura probiótica, hongos ocratoxigénicos, café.

## ABSTRAC

Ochratoxin A is so dangerous that experts from the FAO and WHO (2009) have established a maximum tolerable limit for humans of 100 billionths of a gram per kilogram of body weight per week, following the European Union (2006), establishing maximum allowable limits for Ochratoxin A of 5 ppb in roast and ground coffee and 10 ppb in instant coffee. Locally produced coffee, as well as coffee obtained from imports, does not have records that ensure that coffee for local consumption is free of microorganisms that harm human health. Therefore, the objective of this work was to evaluate the application of *Saccharomyces boulardii* in the reduction of colonies of *Penicillium* and *Aspergillus* in gold and parchment coffee beans collected in storage rooms of a coffee exporter, during the period of September 2019 to November 2020. The probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* was applied at a concentration of  $10^8$  yeast cells/mL for 15 minutes to the samples of parchment and gold coffee beans, which were characterized with the use of a technical sheet that allowed collecting data related to storage conditions. The experimental part was carried out with a completely randomized design with a factorial arrangement and with one repetition; the samples and controls were stored at room temperature conditions; the samples were extracted during 0, 15, 56, 60 and 90 days, making the determinations corresponding to percentage of humidity, total count of molds and yeasts, identification of ochratoxigenic fungi and quantification of ochratoxin A. It was evidenced on day 15 of evaluation of the degree of protection that *Saccharomyces boulardii* has on coffee beans under room temperature conditions. Likewise, a cost-effectiveness analysis was performed to determine the most effective treatment, selecting the C/E index equal to zero or the lowest value, accepting treatments 1 and 2 on day 15 of the analysis.

**KEY WORDS:** Ochratoxin A, *Saccharomyces boulardii*, carcinogen, probiotic yeast, ochratoxin fungi, coffee.

## INTRODUCCIÓN

El café ha sido y sigue siendo uno de los principales cultivos dentro del agro de El Salvador, las etapas de su procesamiento presentan una serie de actividades que implican un control, por lo que la aplicación de prácticas de conservación inadecuadas o deficientes durante el proceso de recolección pueden perjudicar la calidad del producto y ocasionar pérdida de la calidad e inocuidad del grano, resultando como no apto para el consumo humano. La permanencia del grano de café con altos contenidos de humedad (humedad superior al 12%), los tiempos prolongados de los procesos, el contacto con la pulpa y los residuos, así como, los ambientes húmedos y las altas temperaturas en el almacenamiento, son condiciones de riesgo que generan un ambiente propicio para la aparición de hongos ocratoxigénicos como son hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, que pueden dar lugar a la presencia de ocratoxinas, que por su gran estabilidad química, se mantienen intactas durante la preparación industrial de los alimentos, llegando al ser humano por la ingestión. Lo anterior, ha dado lugar a la búsqueda de nuevas alternativas en el proceso de protección de los granos de café, teniendo en cuenta que la aplicación de desinfectantes da lugar a un cambio en el aspecto, color, aroma y textura natural del producto final; en vista de tal situación, se evaluó la aplicación de la *Saccharomyces boulardii* en la reducción de colonias de *Penicillium* y *Aspergillus* en granos de café oro y pergamino recolectadas en cuartos de almacenamiento de una exportadora de café, durante el periodo de septiembre de 2019 a noviembre de 2020.

## **METODOLOGIA.**

La investigación realizada adquirió un enfoque de tipo exploratorio y experimental, ya que el método aplicado no había sido desarrollado previamente en otros trabajos de investigación; el propósito del ensayo, fue obtener resultados de la aplicación de la levadura probiótica (*Saccharomyces boulardii*  $10^8$  células de levadura/mL) para relacionarlos con la disminución de la concentración de ocratoxina A en granos de café oro y pergamino.

### **Caracterización de las condiciones de almacenamiento.**

Se utilizó una ficha técnica para caracterización de lotes de café, la cual permitió obtener información relevante acerca del proceso de cosecha, recolección y almacenamiento de los granos de café; De la caracterización de las muestras se obtuvieron los datos siguientes:

- Descripción de las características de los granos de café al momento de la toma de la muestra.
- Variedad y origen.
- Procedencia o lugar de producción.
- Sistema de cultivo.
- Descripción del proceso de recolección.
- Descripción de las condiciones de almacenamiento reales.
- Humedad del grano.
- Humedad y temperatura del cuarto de almacenamiento.

### **Universo y muestra.**

#### **Universo.**

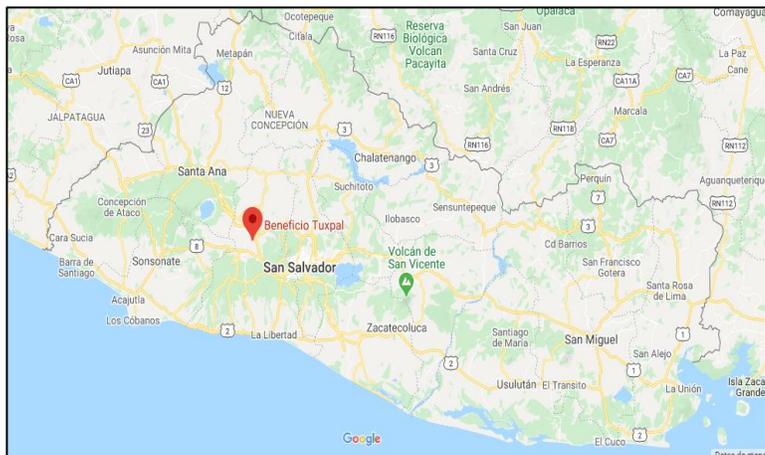
Se consideró como universo para efectos de este estudio los granos de café pergamino y granos de café oro, provenientes de los cuartos de almacenamiento de beneficio y tostaduría respectivamente, obtenidos del beneficio de café Tuxpal, ubicado en San Juan Opico, La Libertad.

#### **Muestra.**

Se consideró como muestra a los granos de café oro y granos de café pergamino equivalentes a 1.0 Kg, previamente caracterizados con la ficha técnica para caracterización de lotes de café.

#### **Sitio de recolección de muestras.**

La recolección de las muestras se realizó en las áreas de almacenamiento de beneficio y de tostaduría de la empresa exportadora de café, ubicada en Carretera a Santa Ana, km 27 ½, Cantón las Delicias, San Juan Opico, La Libertad, El Salvador.



**Figura No. 1** Mapa de ubicación geográfica del beneficio Tuxpal

Previo al muestreo de los granos de café se efectuó la caracterización de los lotes, de los cuales se procedió a la toma de muestra, para lo cual se tuvo en cuenta la metodología propuesta por Franco et al (2014), así como la NMX-F-107-SCFI-2008 y la ISO 4072:1982, la cual establece la metodología de muestreo para café verde en cantidades de 10 o más sacos; y se consideró la cantidad de lotes existentes en cada cuarto de almacenamiento al momento de realizar la toma de muestras. Para ello, se tomó en cuenta lo siguiente:

**Tabla No. 1** Número de muestras recolectadas de acuerdo al tamaño de lote.

Tamaño de lote	Número de muestras a tomar (Kg)
Hasta 50 Kg	Mínimo 3 muestras
De 51 a 500Kg	muestras

Para la recolección de las muestras se utilizó un chuzo de acero inoxidable debidamente sanitizado y se tomaron tres puntos diferentes por cada saco; se extrajeron los granos de café, se colocaron en bolsas plásticas estériles con cierre hermético grado alimenticio, a las que se rotularon con sus respectivas etiquetas de identificación y se procedió a su traslado al laboratorio en contenedores tipo hieleras, debidamente limpios y sanitizados, para evitar cualquier tipo de contaminación. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de la empresa AgroBiotek El Salvador, para realizarles los respectivos análisis y determinaciones según los días correspondientes (0, 15, 56, 60 y 90 días).

Las muestras recolectadas se utilizaron para la verificación de las variables de medición como: porcentaje de humedad, recuento total de mohos y levaduras, identificación de hongos productores de ocratoxina y cuantificación de Ocratoxina A, mediante la prueba para determinación de ocratoxina A AgraQuant® ELISA, las cuales se encuentran resumidas en la Tabla No. 2, que se detalla a continuación.

**Tabla No. 2** Variables de medición para cada uno de los tiempos de análisis.

Tratamiento a aplicar	Tipo de muestra	Tiempo de análisis	Variabes a medir por cada día de análisis
Levadura Probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> .	Café Pergamino (Área de almacenamiento de Beneficio). Café Oro (Área de almacenamiento de Tostaduría).	0 días	-Porcentaje de Humedad. -Recuento total de mohos y levaduras. -Identificación de hongos productores de ocratoxina A. -Cuantificación de ocratoxina A. mediante la prueba para determinación de ocratoxina A AgraQuant® ELISA
		15 días	
		56 días	
		60 días	
		90 días	
Muestras testigos.	Café Pergamino (Área de almacenamiento de Beneficio). Café Oro (Área de almacenamiento de Tostaduría).	0 días	
		15 días	
		56 días	
		60 días	
		90 días	

#### Almacenamiento de las muestras y testigos.

Las condiciones de almacenamiento para las muestras y los testigos fueron a condiciones de temperatura ambiente, lo anterior, para asemejar las condiciones reales donde se resguardan los granos en los beneficios de café.

Para los análisis realizados en los días correspondientes, cada muestra fue extraída del cuarto de almacenamiento donde se encontraron almacenadas para su respectivo análisis; para el caso de la muestra analizada en el día cero, se aclara, que no fue almacenada, sino que el análisis se realizó el mismo día de la recolección de las muestras y al mismo tiempo se aplicó la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*. Para el caso de las muestras testigos, no se les aplicó ningún tipo de tratamiento (levadura probiótica), sin embargo, fueron sometidas a las mismas condiciones que el resto de las muestras del estudio.

#### Reconstitución de la levadura probiótica.

El proceso de reconstitución de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, se realizó a partir de una levadura de tipo comercial, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

- A partir del polvo liofilizado de *Saccharomyces boulardii*, equivalente a  $10^{10}$  células de levadura.
- Se pesó la cantidad de 2.0 g de polvo liofilizado y se procedió a la reconstitución mediante la adición de 100 mL de agua estéril a temperatura ambiente.
- Se homogenizó suavemente con la ayuda de un agitador magnético a 100rpm por 5 min.
- Se dejó reposar durante 20 minutos, a temperatura de 25 –30°C.
- Posteriormente se homogenizó nuevamente a temperatura ambiente durante 5 min.
- Se procedió a extraer en forma estéril y utilizar en las determinaciones respectivas.

## **Estandarización de la levadura probiótica.**

La estandarización de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, se realizó utilizando el método espectrofotométrico a una longitud de onda de 620 nm y según la metodología descrita por Pardo, et al. (2009) y por Solís (2017) tal como se describe a continuación:

- Se extrajo 1.0 mL del líquido reconstituido de *Saccharomyces boulardii* equivalente a  $10^9$  células de levadura/mL.
- Se colocó 1.0 mL de solución reconstituida de *Saccharomyces boulardii* en un tubo de ensayo que contenía 10mL de solución salina estéril y posteriormente se procedió a agitarlo hasta obtener una solución homogénea.
- Se adicionó 1000  $\mu$ L de solución homogénea de *Saccharomyces boulardii* a una celda de cuarzo para realizar la lectura en el espectrofotómetro.
- Se efectuó la lectura en el espectrofotómetro ultravioleta visible a una longitud de onda de 620 nm.
- Se realizaron diluciones para obtener la concentración de  $10^8$  células de levadura/mL, considerando que la absorbancia entre 0.3-0.4 es equivalente a  $0.8 \times 10^8$ - $1.5 \times 10^8$  células de levadura/mL.

De la levadura estandarizada se tomó una alícuota de 1.0mL y se procedió a inocular en placas de Petri a las cuales se les adicionó agar Sabouraud (4% de glucosa) para el mantenimiento de las cepas.

Aplicación de levadura probiótica a granos de café oro y café pergamino.

La aplicación de la *Saccharomyces boulardii*, se realizó después de haber efectuado la estandarización de la levadura probiótica a la concentración de  $10^8$  células de levadura/mL, aplicando la levadura directamente a los granos de café oro y pergamino, mediante el método de sumergimiento durante 15 minutos, en condiciones de temperatura ambiente.

## **Secado de los granos de café oro y café pergamino**

Una vez que se aplicó la levadura probiótica a los granos de café oro y café pergamino, se efectuó el proceso de secado de los granos de café, los cuales se dejaron secar al ambiente en bandejas de secado, entre 1 y 2 días, verificando constantemente la humedad relativa de los granos de café, hasta obtener un porcentaje del 12%; luego las muestras se resguardaron en bolsas plásticas estériles, a condiciones de temperatura ambiente.

## **Variables de Medición en los días de análisis**

### **Determinación del porcentaje de humedad**

La determinación del porcentaje de humedad en granos de café oro y granos de café pergamino, se realizó utilizando una balanza de humedad Ohaus MB45.

Identificación de hongos productores de ocratoxina A, en granos de café oro y café pergamino.

Para la identificación de los hongos productores de ocratoxina A, previamente se realizó, la cuantificación de hongos, mediante la metodología planteada por Camacho et al. (2009), posteriormente, de las placas que presentaron crecimiento de hongos se tomó una muestra y se procedió a realizar la identificación de los hongos mediante el uso del microscopio y guías de identificación, para verificar la existencia de hongos productores de ocratoxina.

### **Cuantificación de hongos productores de ocratoxina A en muestras de café oro y café pergamino.**

Para la cuantificación de hongos productores de ocratoxina en granos de café oro y granos de café pergamino, se procedió de la forma siguiente:

- Se pesó en una balanza semianalítica una muestra de 10 g de café oro o de café pergamino.
- Se procedió a estomachear 10.0 g de muestra de café oro o de café pergamino a 260 rpm por 1 minuto, con 90.0mL de agua peptonada estéril, con esto se obtuvo la dilución  $10^{-1}$ .
- Posteriormente se realizaron diluciones seriadas con agua peptonada 1:10 hasta obtener la dilución  $10^{-4}$ .
- Se inoculó por duplicado 1.0 mL de las diluciones preparadas en placas de Petri.
- Se adicionó aproximadamente 15 - 20mL de Agar Papa Dextrosa (PDA) previamente preparado a las placas de Petri.
- Se homogenizaron las placas de Petri: muestra más medio de cultivo, mediante la técnica en ocho.
- Posteriormente las placas de Petri, se incubaron durante 3 a 5 días a temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Después de los días de incubación, se realizó el recuento de las placas con presencia de colonias de hongos, para posteriormente estimar el promedio de UFC/g por muestra de café oro o muestra de café pergamino. De las placas que presentaron crecimiento de hongos, se realizó la identificación de los hongos, mediante el uso del microscopio.

### **Identificación de hongos productores de ocratoxina mediante el uso de microscopio.**

La identificación de hongos productores de ocratoxina tales como *Penicillium sp* y *Aspergillus sp*, se realizó mediante la tinción al fresco.

### **Cuantificación de la presencia de Ocratoxina A en granos de café oro y café pergamino.**

La cuantificación de la ocratoxina A en las muestras de café oro/café pergamino, se realizó utilizando la prueba para la determinación de ocratoxina A AgraQuant<sup>®</sup> ELISA, para lo cual los pasos a seguir fueron:

- Se prepararon las muestras de análisis mediante el molido de los granos de café oro/café pergamino con un molino de cuchillas hasta la obtención de un polvo fino.
- Se procedió al tamizaje de las muestras utilizando un tamiz de 20 micras.
- Se procedió a pesar una cantidad equivalente a 20 g de polvo de muestra tamizado.
- A las muestras pesadas se les adiciono 30mL de metanol al 70 y se procedió a agitar vigorosamente por 3 minutos.
- Las muestras fueron filtradas para obtener una solución líquida y transparente a la cual se le realizó la medición del pH, verificando que se encontrara entre 6-8.
- Se prepararon los reactivos y el equipo de lectura Stat Fax 4700 ELISA Reader.
- A continuación, se pipetearon 200µL de solución conjugada y se colocaron dentro de los pocillos de dilución.
- Se adicionaron a los micropocillos, 100µL de la solución previamente preparada de las muestras de granos de café oro/café pergamino y muestras testigos.

- Homogenizar la mezcla depositada en los pocillos de dilución utilizando un micropipeteador y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se realizaron 5 lavados de los pocillos de dilución utilizando agua destilada y posteriormente, se procedió al secado de los pocillos con papel absorbente.
- Se adicionó 100µL de solución sustrato y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se adicionó 100µL de solución Stop para detener la reacción de extracción de las muestras.
- Se procedió a realizar la lectura de las muestras utilizando el lector de micropocillos con filtro de 450 nm y filtro diferencial de 630 nm (Stat Fax 4700 ELISA Reader).

Especificación de ocratoxina: el valor de ocratoxinas recomendada se encuentra en 4 µg/kg. Por otra parte, la Unión Europea ha establecido límites máximos admisibles para la ocratoxina A de 5 ppb en el café tostado y molido, y 10 ppb en el café instantáneo.

## **RESULTADOS Y DISCUSION.**

### **Resultados de la aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii***

La aplicación de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, mediante el método sumergimiento, ha permitido identificar que los granos de café oro y pergamino mantuvieron sus características iniciales después de haber pasado por el proceso de secado, lo cual, nos permite establecer que a pesar que la levadura ha sido aplicada, no ha modificado inicialmente las características del grano de café oro y grano de café pergamino.

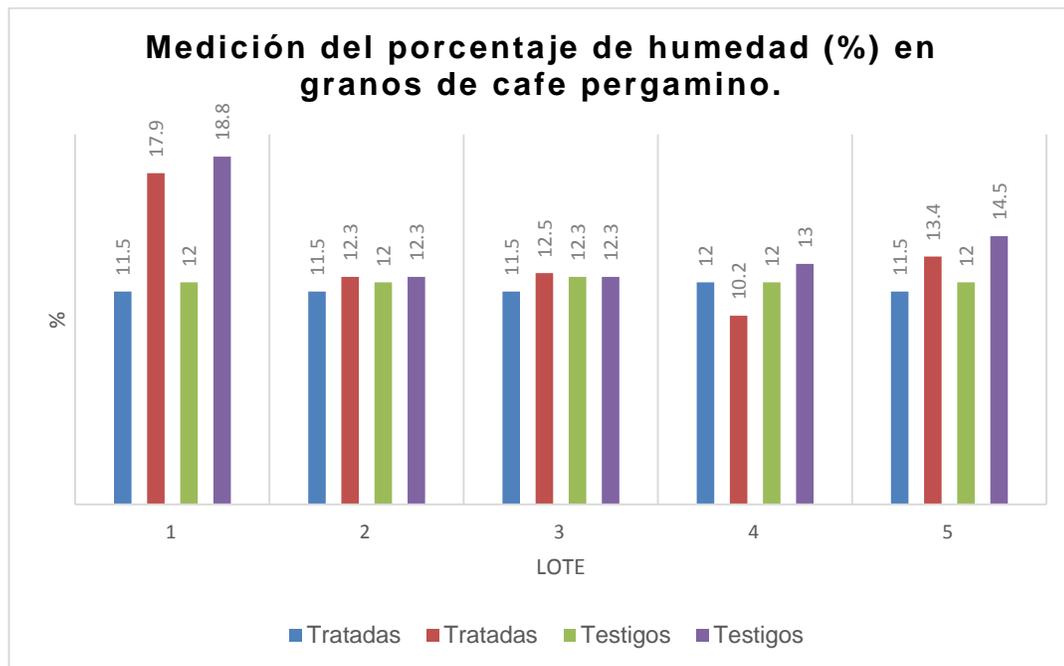
### **Caracterización de las condiciones de almacenamiento y los granos de café oro y pergamino.**

Como resumen del procesamiento de las fichas técnicas utilizadas para la caracterización de los lotes de café, se puede determinar que la bodega de almacenamiento cumple con las recomendaciones emitidas por diferentes asociaciones cafetaleras para el almacenamiento adecuado del café, entre las cuales se pueden mencionar:

- Tarimas separadas del suelo de las “piñas” o sacos de café apilados unos sobre otros, por lo cual existe el espacio de circulación de aire entre el piso y los primeros sacos de café.
- Cada “piña” consta no más de 5 sacos al momento del muestreo.
- Se visualizó que entre el techo y la última estiba existe un espacio prudencial, permitiendo la circulación de aire entre las estibas.
- Existe circulación de aire entre el techo y la pared, y contiene una malla metálica que impide el paso libre de roedores, murciélagos, entre otros a la bodega.
- El porcentaje de humedad del grano al momento del muestreo fue igual al del momento de almacenamiento: 11.5% promedio, esto cumple con la recomendación emitida por las asociaciones cafetaleras de secar el grano entre 11 a 12% para evitar crecimiento de hongos durante el almacenamiento.
- Se visualizaron trampas para roedores dentro y fuera de la bodega, como requisito de salubridad por parte de entidades gubernamentales y por certificaciones internacionales.
- Existe una recubierta plástica en todo el piso de la bodega ya que la zona es propensa a inundaciones en época lluviosa

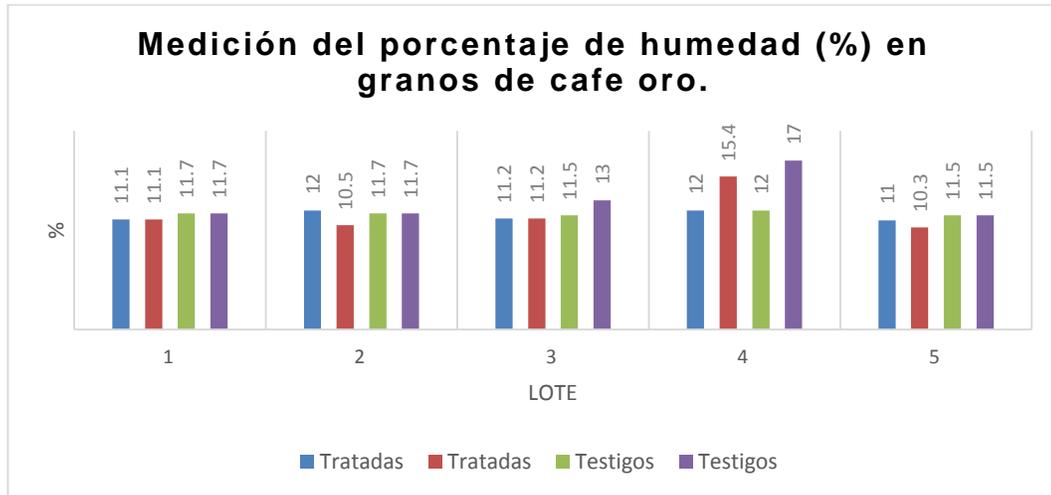
En relación al proceso de secado de los granos de café pergamino a condiciones de temperatura ambiente, se pudo identificar que los granos de café pergamino han presentado un porcentaje de humedad promedio de 11.6%, mientras que para las muestras de café oro tratadas se obtuvo un porcentaje de humedad promedio de 11.46%.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos de las mediciones del porcentaje de humedad al inicio y final de la investigación, lo cual se determinó para los granos de café oro y granos de café pergamino, tanto para las muestras tratadas con la levadura probiótica como para las muestras testigos.



**Figura No. 2** Resultados obtenidos de la medición del porcentaje de humedad en granos de café pergamino al inicio (día cero) y final de la investigación (día noventa).

En el gráfico anterior se observa que la tendencia del porcentaje de humedad, es mayor para las muestras testigos, tanto al inicio como al final, de igual forma, se puede identificar un aumento de humedad en los granos de café oro tratados con la levadura probiótica, aunque el aumento es menor, en comparación con los testigos, por lo que, se puede identificar, que la aplicación de la levadura probiótica no interfiere en el incremento de la medición del porcentaje de humedad, sino más bien, el aumento del porcentaje de humedad, está íntimamente relacionado con las condiciones ambientales y con el proceso de secado que los granos tengan.



**Figura No. 3** Resultados obtenidos de la medición del porcentaje de humedad en granos de café oro al inicio (día cero) y final de la investigación (día noventa).

En el grafico anterior se observa que la tendencia del porcentaje de humedad, es mayor para las muestras testigos, tanto al inicio como al final, de igual forma, se puede identificar un aumento de humedad en los granos de café oro tratados con la levadura probiótica, aunque el aumento es menor, en comparación con los testigos, por lo que, se puede identificar, que la aplicación de la levadura probiótica no interfiere en el incremento de la medición del porcentaje de humedad, sino más bien, el aumento del porcentaje de humedad, está íntimamente relacionado con las condiciones ambientales y con el proceso de secado que los granos tengan.

### **Cuantificación e identificación de hongos productores de ocratoxina A, en granos de café oro y pergamino.**

#### **Identificación de hongos productores de ocratoxina A en muestras de café.**

Se realizó la identificación de hongos del genero *Aspergillus niger*, observando al microscopio cabezas conidiales mostrando conidióforos hialinos, vesículas globosas, esterigmas en una o en dos series, conidios globosos.



**Figura No. 4** *Aspergillus* visto al microscopio.

A continuación, se presenta un cuadro resumen que muestra los promedios de colonias de hongos durante los días 0, 15, 56, 60 y 90 días del ensayo, además se ha determinado el valor de la desviación estándar y el valor de T calculado.

**Tabla No. 3** Resumen de promedios de crecimiento de colonias de *Aspergillus niger* durante los 90 días del análisis.

Día de análisis	Tipo de grano	Tipo de muestra	Promedio	S <sup>2</sup>	Sd	Tc
0	Pergamino	Testigo	0	0	0	0
		Tratadas	0	0	0	0
	Oro	Testigo	0	0	0	0
		Tratadas	0	0	0	0
15	Pergamino	Testigo	0.4	1.6	0.4	1
		Tratadas	0	0	0	0
	Oro	Testigo	0.8	1.73	0.41	1.92
		Tratadas	0	0	0	0
56	Pergamino	Testigo	2	6.66	0.81	2.45
		Tratadas	0.9	1.43	0.37	-2.38
	Oro	Testigo	1.8	4.4	0.66	2.71
		Tratadas	0.5	0.94	0.3	-1.63
60	Pergamino	Testigo	3.4	17.15	1.3	2.6
		Tratadas	2	5.11	0.71	-2.8
	Oro	Testigo	3.4	15.82	1.25	2.7
		Tratadas	1.4	3.15	0.56	-2.49
90	Pergamino	Testigo	4.7	29.34	1.71	2.74
		Tratadas	3	10.66	1.03	-2.9
	Oro	Testigo	4.9	32.76	1.81	2.71
		Tratadas	2.3	7.12	0.84	-2.73

En el caso del cuadro anterior y con Tc (calculado) se aprueban todos aquellos valores que estén más cercanos al valor cero, ya que es más probable que ocurra ese fenómeno o que funcione el tratamiento. Los tratamientos que se aprueban o que están más cerca de cero serían: T1 (pergamino) y T2 (Oro) a los 15 días, teniendo un Tc de cero en ambos casos. Para los siguientes días de medición, aunque se pudo denotar una disminución de protección del grano, se evidenció que hay una ventaja de las muestras tratadas contra los testigos, en ese caso, es importante mencionar que para el día 56 en los granos de café pergamino que fueron tratados con la levadura probiótica, éstos presentaron un valor de -2.38 y los testigos de 2.45; para los granos de café oro los testigos presentaron un valor de 2.71 y las muestras tratadas de -1.63, para este caso, se observó cierta inhibición de crecimientos de colonias en granos oro al día 56 de medición. Para los días 60 y 90 se pudo observar que los resultados se encuentran con valores elevados mayores a un valor de 2.0, para lo cual, se determinó que ya no es probable que ocurra

protección con la aplicación de la levadura probiótica a la concentración de  $10^8$  células de levadura/mL.

**Relación del crecimiento de colonias de *Aspergillus* con el aumento de humedad.**

Se realizó este apartado con el fin de destacar la relación del aumento de humedad en los granos de café, con la aparición de hongos como *Aspergillus* en cuartos de almacenamiento.

**Tabla No. 4** Crecimiento de colonias de *Aspergillus spp* y su relación con la humedad al inicio y final de la investigación en café pergamino.

Granos Pergamino								
Lote	Inicio (día cero)				Final (día noventa)			
	Testigo (UFC)	Testigo (%H)	Tratada (UFC)	Tratada (%H)	Testigo (UFC)	Testigo (%H)	Tratada (UFC)	Tratada (%H)
1	0	12	0	11.5	12	18.8	6	17.9
2	0	12	0	11.5	12	12.3	7	12.3
3	0	12.3	0	11.5	4	12.3	4	12.5
4	0	12	0	12	9	13	7	10.2
5	0	12	0	11.5	10	14.5	6	13.4

En el cuadro anterior se aprecian los resultados de los recuentos de colonias de hongos en granos de café pergamino, tanto en las muestras testigos como para las muestras tratadas con la levadura probiótica. Al inicio del análisis no se evidenció crecimiento de hongos, sin embargo, es evidente el crecimiento de hongos al día 90 de lectura en las muestras testigos como en las muestras tratadas con levadura probiótica; a la misma fecha, los testigos superaron en UFC a las muestras tratadas en los lotes 1, 2, 4 y 5; las muestras tratadas con levadura probiótica que presentaron el aumento en colonias de hongos, se les observó, además, un aumento en la humedad de por lo menos una unidad. Excluyendo al lote 3 que tuvo el mismo crecimiento de UFC a lo largo de la investigación y el porcentaje de humedad en el grano de café pergamino se mantuvo igual en la muestra testigo mientras que en las muestras tratadas solo se identificó un aumento del 1%.

**Tabla No. 5** Crecimiento de colonias de *Aspergillus spp* y su relación con la humedad al inicio y final de la investigación en café oro.

Granos Oro								
Lote	Inicio (día cero)				Final (día noventa)			
	Testigo (UFC)	Testigo (%H)	Tratada (UFC)	Tratada (%H)	Testigo (UFC)	Testigo (%H)	Tratada (UFC)	Tratada (%H)
6	0	11.7	0	11.1	12	11.7	5	11.1
7	0	11.7	0	12	7	11.7	3	10.5
8	0	11.5	0	11.2	6	13	3	11.2
9	0	12	0	12	9	17	5	15.4
10	0	11.5	0	11	15	11.5	7	10.3

En el cuadro anterior se aprecia que no hubo un aumento significativo en el porcentaje de humedad de cada lote analizado, sin embargo, hubo crecimiento de UFC mayor en las muestras testigos que en las muestras tratadas con la levadura probiótica al día 90 de la evaluación. Lo que advierte que se tuvo crecimiento de hongos en los granos de café oro, después de 90 días de almacenamiento.

Al realizar una comparación entre las muestras testigos de los granos de café pergamino y los granos de café oro, se pudo observar mayor crecimiento de UFC en los granos de café pergamino tanto en las muestras tratadas con la levadura probiótica como en las muestras testigos, lo que permitió inferir que existe la probabilidad que sea por la presencia del pergamino o pulpa que se secó sobre la semilla y que al ser almacenada de esta forma, aumento su humedad interna dentro del cuarto de almacenamiento.

En los granos de café oro no se evidenció un aumento significativo en el porcentaje de humedad en comparación con los granos de café pergamino.

#### Cuantificación de la presencia de Ocratoxina A en granos de café oro y pergamino.

**Tabla No. 6** Recuento de OTA durante el día cero, en granos de café pergamino después de la aplicación de *S. boulardii*.

<b>Recuento de ocratoxina A en granos de café pergamino en el día cero de análisis</b>				
<b>Lote</b>	<b>Testigos</b>		<b>Tratadas</b>	
	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>
1	1.057	<LOD(1.9ppb)	1.057	<LOD(1.9ppb)
2	1.03	<LOD(1.9ppb)	1.03	<LOD(1.9ppb)
3	0.95	<LOD(1.9ppb)	0.95	<LOD(1.9ppb)
4	0.9	<LOD(1.9ppb)	0.9	<LOD(1.9ppb)
5	1.06	<LOD(1.9ppb)	1.06	<LOD(1.9ppb)

El recuento de ocratoxina A en granos de café pergamino al día cero, tanto para las muestras testigos como para las muestras tratadas es relativamente similar ya que los valores de absorbancia obtenidos para los testigos como para las muestras tratadas ha sido el mismo, por lo que al inicio del análisis se parte de recuentos iguales de ocratoxina A.

**Tabla No. 7** Recuento de OTA durante el día quince, en granos de café pergamino después de la aplicación de *S. boulardii*.

<b>Recuento de ocratoxina A en granos de café pergamino en el día 15 de análisis</b>				
<b>Lote</b>	<b>Testigos</b>		<b>Tratadas</b>	
	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>
1	1.057	<LOD(1.9ppb)	1.22	<LOD(1.9ppb)
2	0.92	<LOD(1.9ppb)	1.116	<LOD(1.9ppb)
3	0.84	<LOD(1.9ppb)	1.262	<LOD(1.9ppb)
4	0.9	<LOD(1.9ppb)	1.158	<LOD(1.9ppb)
5	0.93	<LOD(1.9ppb)	1.282	<LOD(1.9ppb)

En el cuadro anterior podemos notar que a los 15 días los granos de café pergamino con la levadura probiótica, sobrepasaron el valor de 1 en absorbancia, lo que significa que la concentración de ocratoxina A es menor en las muestras de café pergamino en comparación con las testigos, ya que solo el lote 1 de los testigos obtuvo un valor de 1.057 de absorbancia y las demás quedaron por debajo de 1, lo cual indica que la concentración de Ocratoxina A es mayor en los testigos que en las muestras tratadas con levadura probiótica.

**Tabla No. 8** Recuento de OTA durante el día noventa, en granos de café pergamino después de la aplicación de *S. boulardii*.

<b>Recuento de ocratoxina A en granos de café pergamino en el día 90 de análisis</b>				
<b>Lote</b>	<b>Testigos</b>		<b>Tratadas</b>	
	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>
1	0.073	63.45	0.193	40.04
2	0.065	69.55	0.062	72.18
3	0.063	71.28	0.057	77.08
4	0.072	62.45	0.053	81.57
5	0.065	69.55	0.056	78.16

Al día 90 de análisis, tanto los testigos como las muestras tratadas con levadura probiótica presentaron un valor de transmitancia muy por debajo de cero, esto se traduce que a los 90 días del ensayo tanto los testigos como las muestras tratadas con levadura tienen concentraciones altas de OTA, en este punto podemos asumir que la levadura ya no ejerce su eficacia protectora.

**Tabla No. 9** Recuento de OTA durante el día cero, en granos de café oro después de la aplicación de *S. boulardii*.

<b>Recuento de ocratoxina A en granos de café oro en el día cero de análisis</b>				
<b>Lote</b>	<b>Testigos</b>		<b>Tratadas</b>	
	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>
6	0.957	<LOD(1.9ppb)	1.1	<LOD(1.9ppb)
7	0.9	<LOD(1.9ppb)	1.08	<LOD(1.9ppb)
8	0.957	<LOD(1.9ppb)	0.957	<LOD(1.9ppb)
9	1.06	<LOD(1.9ppb)	0.979	<LOD(1.9ppb)
10	1.02	<LOD(1.9ppb)	1.059	<LOD(1.9ppb)

En el día cero del análisis de las muestras de café oro, se identifica discrepancia en los valores obtenidos de las mediciones absorbancia, siendo los lotes 6, 7 y 8 de los testigos los que presentan valores de absorbancia por debajo del valor de 1, lo que significa una elevada cantidad de ocratoxina A, mientras que los lotes 9 y 10 de los testigos se mantienen con baja cantidad de ocratoxina, ya que los valores de absorbancia son mayores a 1. Por otra parte, en relación con las muestras tratadas con levadura probiótica se puede evidenciar que únicamente los lotes 8 y 9 presentan valores de absorbancia por debajo del valor de 1; mientras que las muestras tratadas con levadura probiótica, pertenecientes a los lotes 6, 7 y 10 presentan valores mayores de absorbancia mayores a 1, considerando un valor bajo de ocratoxina A.

**Tabla No. 10** Recuento de OTA durante el día quince, en granos de café oro después de la aplicación de *S. boulardii*.

<b>Recuento de ocratoxina A en granos de café oro en el día 15 de análisis</b>				
<b>Lote</b>	<b>Testigos</b>		<b>Tratadas</b>	
	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>
6	0.926	2.11	1.146	<LOD(1.9ppb)
7	0.854	3.35	1.08	<LOD(1.9ppb)
8	0.957	<LOD(1.9ppb)	0.957	<LOD(1.9ppb)
9	0.979	<LOD(1.9ppb)	0.979	<LOD(1.9ppb)
10	0.93	2.04	1.059	<LOD(1.9ppb)

A los 15 días del ensayo, se observa que en los granos de café oro tratados con la levadura probiótica, solamente los lotes 8 y 9 mostraron lecturas por debajo de cero, mientras los lotes 6, 7 y 10 sobrepasaron el valor de absorbancia de 1, es decir, se identifica un valor bajo de ocratoxina A. En relación a los testigos, se identifica que mostraron niveles de absorbancia por debajo del valor de 1 en todos los lotes, es decir presentan una elevada concentración de ocratoxina A. Por lo tanto, al día 15 del ensayo se puede determinar que el efecto protector de la levadura probiótica en los granos de café oro, únicamente se puede evidenciar en las muestras de los lotes 6, 7 y 10, mientras que los lotes 8 y 9 presentan resultados similares al de los testigos.

**Tabla No. 11** Recuento de OTA durante el día noventa, en granos de café oro después de la aplicación de *S. boulardii*.

<b>Recuento de ocratoxina A en granos de café oro en el día 90 de análisis</b>				
<b>Lote</b>	<b>Testigos</b>		<b>Tratadas</b>	
	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>	<b>Abs.</b>	<b>Ocratoxina (ppb)</b>
6	0.078	60.19	0.057	77.08
7	0.085	56.18	0.055	79.26
8	0.063	71.28	0.057	77.08
9	0.065	69.55	0.058	76.05
10	0.074	62.77	0.103	48.06

En los granos de café oro a los 90 días del ensayo, tanto las muestras tratadas como los testigos presentaron niveles de absorbancia muy por debajo de cero lo que se traduce a una alta concentración de Ocratoxina A, por lo anterior, puede establecerse que al igual que en los granos de café pergamino donde todas las muestras tratadas con levadura probiótica y los testigos mostraron niveles de absorbancia por debajo cero, se puede determinar que a los 90 días del ensayo, la eficacia de protección de la levadura sobre los granos de café oro y pergamino es nula.

Con los datos anteriores se determinó que para los días cero y quince del ensayo las mediciones de ppb de OTA se mantuvieron por debajo de 1,9 ppb lo cual cumple con el límite máximo admisible para OTA de 5 ppb en café tostado y molido según parámetros establecidos por la Unión Europea (2006).

### **Análisis costo-efectividad de la aplicación del método con *Saccharomyces boulardii*.**

Se realizó el análisis de dominancia el cual se efectuó, primero, ordenando los tratamientos de menor a mayor costo variable y un menor porcentaje de efectividad, lo anterior se detalla en la tabla No. 12, en la que se establecen los tratamientos con cada día de medición de OTA para determinar el Índice Costo-Efectividad.

**Tabla No. 12** Tratamientos con cada día de medición para OTA para determinar el Índice Costo-Efectividad.

<b>Tratamiento</b>	<b>Día de medición</b>	<b>% promedio de efectividad</b>	<b>Costo Variable (\$)</b>	<b>Índice C/E (\$/% de efectividad)</b>
T1	0	103.4	5.42	0.052
	15	104.42	5.42	<b>0.051</b>
	90	6.6	5.42	0.821
T2	0	99.94	5.42	0.054
	15	120.76	5.42	<b>0.044</b>
	90	8.42	5.42	0.643
Testigo (café oro)	0	97.88	0	0
	15	92.92	0	0
	90	7.3	0	0
Testigo (café pergamino)	0	99.94	0	0
	15	92.94	0	0
	90	6.76	0	0

Para seleccionar el tratamiento más económico y de mayor efectividad, a partir del cuadro anterior, es importante recordar que se hizo la aplicación de la levadura una sola vez en el día cero de cada tratamiento, excepto en los testigos. Motivo por el cual no aparecen los valores de los costos en los días 15 y 90 de cada tratamiento; ya que uno de los objetivos ha sido observar los días control de la levadura sobre la producción de OTA en el grano de café con solo una aplicación.

Para determinar cuál tratamiento obtuvo mayor efectividad se selecciona aquel cuyo índice C/E es igual a cero o el valor más bajo. Dado el caso se aceptan los tratamientos 1 y 2 al día 15 cada uno con valores de 0.051 y 0.044 respectivamente.

### **CONCLUSIONES**

La información que se presenta en este estudio sienta un precedente en el uso de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* en la reducción de hongos productores de ocratoxina como *Penicillium* y *Aspergillus*, lo cual al día 15 de evaluación el grado de protección que *Saccharomyces boulardii* presenta sobre los granos de café en condiciones de temperatura ambiente es favorable. La cuantificación de la ocratoxina A en granos de café oro y pergamino ha permitido evidenciar el grado de protección que la levadura probiótica ejerce sobre los granos de café en condiciones de temperatura ambiente. Al día 90 del ensayo tanto los testigos como las muestras tratadas con levadura probiótica, ya sea para los granos de café oro como para los de café pergamino, se identificaron concentraciones elevadas de ocratoxina A por arriba del límite

admisible establecido por la Unión Europea (2006), por lo tanto, se puede establecer que la eficacia de protección es nula. En relación a los resultados obtenidos de la medición del porcentaje de humedad al inicio (día cero) y al final de la investigación (día noventa), se determinó que la aplicación de la levadura probiótica no interfiere en el incremento de la medición del porcentaje de humedad, sino más bien, el aumento del porcentaje de humedad está íntimamente relacionado con las condiciones ambientales y con el proceso de secado que los granos tengan.

El análisis costo efectividad permitió determinar el tratamiento que obtuvo mayor efectividad seleccionando aquel cuyo índice C/E es igual al valor cero o el valor más bajo. Dado el caso se aceptaron los tratamientos 1 y 2 al día 15 de la investigación, con valores de 0.051 y 0.044 respectivamente.

Finalmente, en cuanto a las características sensoriales de los granos de café oro y café pergamino no fue posible efectuarse, debido a la pandemia por Covid-19, por lo que queda la incertidumbre en función de determinar si la levadura probiótica puede o no afectar las características sensoriales del café y si esto puede o no favorecer la aceptabilidad por parte del consumidor final.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por habernos guiado en este proyecto y permitirnos culminar nuestros estudios de maestría y a nuestros docentes asesores y evaluadores de la maestría en microbiología e inocuidad de alimentos de la Universidad de El Salvador, por enriquecer el presente trabajo con sus conocimientos y aportes brindados.

Al Laboratorio de microbiología de la empresa AgroBiotek, por su completa colaboración en la parte experimental del presente estudio y al Beneficio Tuxpal, por abrirnos las puertas de su empresa para realizar las tomas de muestras y por facilitarnos de sus instalaciones para realizar esta investigación.

## **REFERENCIAS**

1. Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B. y Velázquez, O. (2009) Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Biología. México D.F., 2009.
2. Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO y la OMS y la Organización Mundial de la Salud. (1995). Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes: cuadragésimo cuarto informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Organización Mundial de la Salud. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37246/WHO\\_TRS\\_859.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37246/WHO_TRS_859.pdf)
3. Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO y la OMS y la Organización Mundial de la Salud. (2009). Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. CXS 193-1995. Normas Internacionales de los Alimentos. Codex Alimentarius. [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode\\_x%252FStandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS\\_193s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode_x%252FStandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193s.pdf)
4. Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2003). Norma Salvadoreña. Estándares de Calidad para el Café de Comercialización Nacional e Internacional. (NSO 67.31.01:03).

<https://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/NORMAS/CAFE/EDICIONFINALCAFE/AFEVERDE.pdf>

5. Concejo Salvadoreño del café. (mayo 30, 2019). Estadísticas Cafetaleras de El Salvador. Variación de Historial de Producción de Café. <http://www.csc.gob.sv/>
6. Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E., & Porat, R. (2002). Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*, 92(4), 393–399. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.4.393>
7. ELIKA. (2013). Ocratoxina A (ficha técnica). ELIKA. <https://alimentacion-animal.elika.eu/wp-content/uploads/sites/6/2017/12/OCRATOXINA-A-2012-maquetado.pdf>
8. Franco, H., Vega, A., Reyes, S., De León, J., Bonilla, A. (2014). Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64(1), 42-49. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222014000100006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222014000100006&lng=es&tlng=es).
9. Leonard, H. (2008). Criterios de selección y mecanismos de acción de cepas de levadura para uso como aditivo probiótico en animales. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XLII (1-3), 38-45. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120667006>
10. López, A., Jiménez, A., Ezpezeleta, O., Bello, J. (2000). Efectos Tóxicos de la Ocratoxina A. *Revista de Toxicología*, (17), 61-69. [http://www.adiveter.com/ftp\\_public/articulo804.pdf](http://www.adiveter.com/ftp_public/articulo804.pdf)
11. Mally, A., Dekant, W. (2009). Mycotoxins and the kidney: modes of action for renal tumor formation by ochratoxin A in rodents. *Molecular nutrition & food research*, 53(4), 467–478. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800149>
12. Melo, P., Carvalho, D., Pedroni, A., Soccol, V., Neto, E., Woiciechowski, A., Soccol, C. (2016). Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. *International Journal of Food Science and Technology*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.13142>
13. Miranda, C., Ortiz, E., Arvizu, S., Ramiro, J., Aldrete, J., Martínez R. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México. *Revista SciELO* 49(7), 759-773. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952015000700005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952015000700005&lng=es&tlng=es).
14. Moreno, E. (1988). Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados (1ª ed.). Universidad Autónoma de México.
15. Organización Internacional de Estandarización. (1995). Determinación del Contenido de Humedad. Método de Rutina (ISO 1447). <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/6044/4203fddfde5b476baa72b1123fb250b3/SIST-ISO-1447-1995.pdf>
16. Organización Internacional de Estandarización. (2009). Cereales y productos derivados. Toma de muestras (ISO 24333). [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_iso\\_24333.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_24333.pdf)
17. Organización Internacional de Estandarización. (2017). Café verde en sacos. Muestreo. (ISO 4072). <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:4072:ed-1:v1:en>

18. Pardo, S., Galvagno, M., Cerruti, P. (2009). Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del pre acondicionamiento fisiológico. *Revista Iberoamericana de Micología* 26(2),155-160. <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-estudios-viabilidad-vitalidad-frente-al-13139640>
19. Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. y Pavlovic, M. (2000). Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. Organización Mundial de la Salud. Recopilación de artículos No. 2, 2000. [http://whqlibdoc.who.int/boletin/2000/RA\\_2000\\_2\\_80-92\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/boletin/2000/RA_2000_2_80-92_spa.pdf)
20. Pimenta, R. S., Silva, F. L., Silva, J. F., Morais, P. B., Braga, D. T., Rosa, C. A., Corrêa, A., Jr. (2008). Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 39(1), 85–90. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080001000020>
21. Puerta, G. I. (2008). Riesgos para la calidad y la inocuidad del café en el secado. *Avances Técnicos Revista Cenicafe* (371), 2-8. <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/399/1/avt0371.pdf>
22. Quintana, E. M., Guerrero, F. A., Chaves, J. A. (2007). Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA. *Revista SciELO*, 57(2), 168-172. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222007000200010&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000200010&lng=es&tlng=es).
23. Ramírez, J. A. (2006). Documento integrado realizado en el beneficio Santiago Atitlán como contribuciones para mejorar la producción de café en Santiago Atitlán, Sololá. [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos Guatemala, Facultad de Agronomía]. <https://repositoriosidca.csuca.org/>
24. Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A., Hardisson de la Torre, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Revista de Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215-1226. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112011000600004&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000600004&lng=es&tlng=es).
25. Solís, L. (2017). Presentación de un diseño e innovación de la fermentación del café en el procesamiento del café utilizando levaduras. [Presentación de PowerPoint]. <https://www.luxia.coffee/ftc>
26. Unión Europea. (2006). Reglamento (CE) No 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea L*, 364(5), 20.
27. Urbano, G. R., Taniwaki, M. H., Leitão, M. F., Vicentini, M. C. (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of food protection*, 64(8), 1226–1230. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.8.1226>
28. Vallejos, C. (2006). Estudios comparativos para la determinación de Ocratoxina A en granos de café verde. *Central American Journals Online*, (73), 60–76. <https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i73.3720>
29. Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., Jespersen, L. (2004). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiology*, (101), 29-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039>
30. Zarco, E. (2003). Manual del Caficultor. Ed. Fundación PROCAFE. Nueva San Salvador, El Salvador, 78-86. <https://biblioteca.ugb.edu.sv/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=6636>