

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**INFLUENCIA DE *Penicillium* TOXIGÉNICO Y NO
TOXIGÉNICO EN EL PERFIL VOLÁTIL DEL CAFÉ
FILTRADO Y DEL GRANO VERDE**

Autor: Bach. Heiner Guiop Huaman

Asesores:

M. Sc. Aline Camila Caetano

Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova

Mg. Ralph Stein Rivera Botonares

Registro: ---

CHACHAPOYAS – PERÚ

2023



ANEXO 3-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): GUIOP HUAMAN HEINER
DNI N°: 71323204
Correo electrónico: heiner99199@gmail.com
Facultad: Ingeniería y Ciencias Agrarias
Escuela Profesional: Ingeniería Agroindustrial

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes):
DNI N°:
Correo electrónico:
Facultad:
Escuela Profesional:

2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

INFLUENCIA DE Penicillium TOXIGÉNICO Y NO TOXIGÉNICO EN EL PERFIL VOLÁTIL DEL CAFE FILTRADO Y DEL GRANO VERDE

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: M.Sc CAETANO ALINE CAMILA
DNI, Pasaporte, C.E N°: 001630382
Open Research and Contributor-ORCID (https://orcid.org/0000-0002-9670-0970) https://orcid.org/0000-0002-9910-8518

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Dr. MANSILLA CORDOYA PEDRO JAVIER
DNI, Pasaporte, C.E N°: 41956401
Open Research and Contributor-ORCID (https://orcid.org/0000-0002-9670-0970) https://orcid.org/0000-0002-9560-7698

4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Immunología)

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html
2.11.01 - Alimentos y bebidas

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la Licencia creative commons de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 20 de abril, 2023

[Signature]

Firma del autor 1

Firma del autor 2

[Signature]

Firma del Asesor 1

[Signature]

Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

A mis padres por haber creído en mí siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio, inculcándome valores desde muy pequeño, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre lo que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero siempre con la motivación constante para alcanzar mis anhelos.

Gracias padre y madre.

Heiner Guiop Huaman

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios por la salud, alimentación, educación y por otorgarme una familia maravillosa. Gracias papá Guillermo Guiop Guiop y mamá Mabel Huaman Puiquin por apoyarme en cada decisión y proyecto. Gracias por permitir cumplir con excelencia el desarrollo de esta tesis y gracias a la vida porque cada día me enseña lo hermosa que es y lo justa que puede llegar a ser.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Facultad de Ingeniería y Ciencia Agrarias, a la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial por darme la oportunidad de tener una experiencia maravillosa, y a todos los docentes por compartir sus conocimientos durante mi formación académica y profesional.

Al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) por su apoyo con la infraestructura que hizo posible la ejecución de este trabajo en las áreas de la Clínica Fitopatológica (LABISANV) y Cromatografía de Gases (FISIOBVEG) y a todas las personas que lo conforman.

A mi asesora la M.Sc. Aline Camila Caetano y mis coasesores el Ph.D. Pedro Javier Mansilla Córdova y Mg. Ralph Stein Rivera Botonares, por su liderazgo, conocimiento, enseñanza, integridad y cooperación que hizo posible el desarrollo de este trabajo.

Al Bach. Jhon Danfer Dávila García por su apoyo con pautas y principios en el desarrollo de la ejecución de la tesis y a su familia por proporcionar el material de estudio utilizado (café).

Al Ing. Segundo Grimaldo Chavez Quintana por el apoyo para la adquisición de una incubadora para la Clínica Fitopatológica, la que sirvió para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Natalie Verónika Rondinel Mendoza por su disposición en apoyarme en el proceso de análisis estadístico de los resultados.

Al Ph. D. Celso Blatt, Cientista de Aplicaciones de la empresa Agilent Technologies Brasil, quien viene apoyando en la solución de desafíos rutinarios en el GC-MS desde el inicio a la MSc. Aline Caetano, por lo que parte de las mejoras metodológicas aplicadas en esta investigación se debe a él.

A la Universidad Nacional de Jaén por la subvención de la tesis, mediante el proyecto “Perfil de compuestos orgánicos volátiles del grano verde y de la bebida de café determinado por GC-MS” - VOCCOFFEE, ganador del Prointec-2021, con Resolución de Vicepresidencia de Investigación N° 400-2022-UNJ.

El camino no ha sido fácil hasta ahora, pero gracias a sus aportes, amor, amabilidad y apoyo, la complejidad de lograr este objetivo se ha vuelto más fácil. Les agradezco a todos y les expreso mi gran afecto.

Heiner Guiop Huaman

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

RECTOR

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA

VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Dr. ERICK ALDO AUQUÍNIVIN SILVA

DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS



ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada INFLUENCIA DE *Penicillium* TOXIGÉNICO Y NO TOXIGÉNICO EN EL PERFIL VOLÁTIL DEL CAFÉ FILTRADO Y DEL GRANO VERDE del egresado Bach. HEINER GUIDO HUAMAN de la Facultad de INGENIERIA Y CIENCIAS AGRARIAS Escuela Profesional de INGENIERIA AGROINDUSTRIAL de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 20 de abril de 2023

Aline Camila Caetano

Firma y nombre completo del Asesor

Aline Camila Caetano

CE: 0016 30382



ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada INFLUENCIA DE *Penicillium* TOXIGÉNICO Y NO TOXIGÉNICO EN EL PERFIL VOLÁTIL DEL CAFÉ FILTRADO Y DEL GRAND VERDE del egresado Bach. HEINER GUIDO HUAMAN de la Facultad de INGENIERIA Y CIENCIAS AGRARIAS Escuela Profesional de INGENIERIA AGROINDUSTRIAL de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 20 de abril de 2023

Firma y nombre completo del Asesor
Pedro Javier Mansilla Cordova
DNI: 41956401



ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada INFLUENCIA DE *Penicillium* TOXIGÉNICO Y NO TOXIGÉNICO EN EL PERFIL VOLÁTIL DEL CAFÉ FILTRADO Y DEL GRANO VERDE del egresado Bach. HEINER GUIDO HUAMAN de la Facultad de INGENIERIA Y CIENCIAS AGRARIAS Escuela Profesional de INGENIERIA AGROINDUSTRIAL de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 20 de abril de 2023

Firma y nombre completo del Asesor

Ralph Stein Rivera Botonares
DNI: 3273 2260

JURADO EVALUADOR DE TESIS



M.Sc. SEGUNDO GRIMALDO CHAVEZ QUINTANA

PRESIDENTE



M.Sc. GROBERT AMADO GUADALUPE CHUQUI

SECRETARIO



Dr. MEREGILDO SILVA RAMIREZ

VOCAL



ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

INFLUENCIA DE Penicillium TOXIGÉNICO Y NO TOXIGÉNICO EN EL PERFIL VOLÁTIL DEL CAFÉ FILTRADO Y DEL GRANO VERDE

presentada por el estudiante ()/egresado (x) HEINER GUIDO HUAMAN

de la Escuela Profesional de INGENIERIA AGRINDUSTRIAL

con correo electrónico institucional 7132320472@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 21 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 12 de abril del 2023

[Signature]
SECRETARIO

[Signature]
VOCAL

[Signature]
PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....



ANEXO 3-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 28 de ABRIL del año 2023, siendo las 15:00 horas, el aspirante: HEINER GUIOP HUAMAN, asesorado por M.Sc. ALINE CAHILA CAETANO defiende en sesión pública presencial (X) / a distancia () la Tesis titulada: INFLUENCIA DE Penicillium TOXIGÉNICO Y NO TOXIGENICO EN EL PERFIL VOLÁTIL DEL CAFÉ FILTRADO Y DEL GRAND VERDE, para obtener el Título Profesional de INGENIERO AGRINDUSTRIAL, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: MSc. SEGUNDO GRIMALDO CHAVEZ QUINTANA
Secretario: MSc. ROBERT AMADO GUADALUPE CHUQUI
Vocal: Dr. MEREGILDO SILVA RAMIREZ.

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (X) por Unanimidad (X)/Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 16:10 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

SECRETARIO

VOCAL

PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....

ÍNDICE

RESUMEN	xviii
ABSTRACT.....	xix
I. INTRODUCCIÓN.....	20
II. MATERIAL Y MÉTODOS	22
2.1 Lugar de ejecución	22
2.2 Material de estudio	22
2.3 Caracterización morfológica de <i>Penicillium</i>	22
2.4 Obtención de cultivos monospóricos	23
2.5 Análisis de la producción de micotoxinas.....	24
2.6 Humedad de los granos de café verde	24
2.7 pH de los granos de café verde.....	24
2.8 Conteo de esporas.....	25
2.9 Inoculación de granos de café con aislados de <i>Penicillium</i>	25
2.10 Tostado y molido de los granos de café	26
2.11 Preparación de la bebida de café	26
2.12 Análisis de COV de la bebida de café.....	27
2.13 Análisis de COV de los granos de café verde	27
2.14 Análisis de COV producidos por los microorganismos	28
2.15 Identificación de compuestos orgánicos volátiles	28
2.16 Análisis de datos.....	28
III. RESULTADOS	30
3.1. Caracterización morfológica de los aislados de <i>Penicillium</i>	30
3.2. Análisis de producción de micotoxinas.....	34
3.3. Determinación del porcentaje de humedad y pH de los granos de café.....	34
3.4. Calibración de esporas e inoculación de granos con esporas de <i>Penicillium</i>	36
3.5. Tostado de granos de café inoculados y sin inocular	37

3.6. Compuestos orgánicos volátiles de la bebida de café	38
3.7. Compuestos orgánicos volátiles de los granos verdes esterilizados.....	43
3.8. Compuestos orgánicos volátiles de los hongos en medio inerte	47
IV. DISCUSIÓN.....	53
V. CONCLUSIONES.....	63
VI. RECOMENDACIONES	63
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura morfológica del conidióforo de <i>Penicillium</i>	23
Figura 2 Cuantificación de esporas, (I) Cámara de Neubauer, (II) Cuadrantes con aumento de 40X y (III) con aumento de 400X indicando los 5 cuadrantes donde se realizó el conteo	26
Figura 3 Apariencia macroscópica de <i>Penicillium</i> no toxigénico en diferentes medios de cultivo (a hasta h) y conidióforos (i, j), incubados a 25 °C por 7 días, barras = 20 µm	30
Figura 4 Apariencia macroscópica de <i>Penicillium</i> toxigénico 1, en diferentes medios de cultivo (a hasta h) y conidióforos (i, j), incubados a 25 °C por 7 días, barras = 20 µm .	32
Figura 5 Apariencia macroscópica de <i>Penicillium</i> toxigénico 2, en diferentes medios de cultivo (a hasta h) y conidióforos (i, j), incubados a 25 °C por 7 días, barras = 20 µm .	33
Figura 6 Fluorescencia de cepas de <i>Penicillium</i> en medio CAM bajo luz UV, incubados por 5 días a 30 °C.....	35
Figura 7 Cepas de <i>Penicillium</i> en medio CYA, incubadas a 25 °C por 10 días para la obtención de suspensión de esporas.....	36
Figura 8 Granos no inoculados (Control) e cepas de <i>Penicillium</i> sembrados en medio DG18 e incubados por 7 días a 25 °C	37
Figura 9 Registro del tiempo y temperatura de tostado de granos verdes de café en estufa.....	37
Figura 10 Diagrama de cajas y bigotes de los COV de la bebida de café preparada con grano esterilizado	39
Figura 11 Gráfico de doble proyección de los COV de los tratamientos PNT-BC, PT1-BC, PT2-BC y BC	40
Figura 12 Dendrograma de los COV de la bebida del café	41
Figura 13 Dendrograma de los COV de la bebida de café agrupados según tratamientos	42
Figura 14 Diagrama de cajas y bigotes de los COV del grano verde de café esterilizado	44
Figura 15 Gráfico de doble proyección de los COV de los tratamientos PNT-GV, PT1-GV, PT2-GV y GV	45
Figura 16 Dendrograma de los compuestos volátiles del grano verde	46
Figura 17 Dendrograma de los COV del grano verde agrupados según tratamientos...	48

Figura 18 Diagrama de cajas y bigotes de los COV de los hongos.....	49
Figura 19 Gráfico de doble proyección de los COV de los tratamientos PNT-CYA, PT1-CYA, PT2-CYA y CYA	50
Figura 20 Dendrograma de compuestos volátiles de los hongos.....	51
Figura 21 Dendrograma de los COV de los hongos en medio de cultivo CYA agrupados según tratamientos	52
Figura 22 Proceso de obtención de un cultivo puro a partir de punta de hifa, (a) técnica de estriado, (b) observación de esporas individualizadas y (c) recorte bajo el estereoscopio.....	73
Figura 23 Cepas de <i>Penicillium</i> en medio CYA, incubadas a 37°C por 7 días. PNT (primera fila de a, c, b y d), PT1 (segunda fila de a y c) y PT2 (segunda fila de b y d) .	73
Figura 24 Diagrama de cajas y bigotes del pH de los granos de café esterilizados y sin esterilizar.....	75
Figura 25 Diagrama de cajas y bigotes del contenido de humedad de los granos de café esterilizados y sin esterilizar	75
Figura 26 Diagrama de cajas y bigotes de los COV del BC.....	76
Figura 27 Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PNT-BC.....	77
Figura 28 Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PT1-BC.....	78
Figura 29 Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PT2-BC.....	79
Figura 30 Diagrama de cajas y bigotes de los COV del GV	80
Figura 31 Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PNT-GV	81
Figura 32 Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PT1-GV	82
Figura 33 Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PT2-GV	83
Figura 34 Diagrama de cajas y bigotes de los COV emitidos por el medio de cultivo CYA.....	84
Figura 35 Diagrama de cajas y bigotes de los COV emitidos por el PNT-CYA.....	85
Figura 36 Diagrama de cajas y bigotes de los COV emitidos por el PT1-CYA	86
Figura 37 Diagrama de cajas y bigotes de los COV emitidos por el PT2-CYA	87

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Codificación de los tratamientos con la descripción de las variables consideradas para la determinación del perfil de COV en el café inoculado con cepas de <i>Penicillium</i>	29
Tabla 2 Efecto del procedimiento de esterilización por autoclavado en la humedad y el pH de granos verdes de café	35
Tabla 3 Concentración de esporas.mL ⁻¹ de cepas de <i>Penicillium</i> utilizadas para inocular granos de café esterilizados	36
Tabla 4 Valores propios de la matriz de correlación de los COV de la bebida, CP = componente principal.....	40
Tabla 5 Valores propios de la matriz de correlación de los COV del grano verde, CP = componente principal.....	45
Tabla 6 Valores propios de la matriz de correlación de los COV de los microorganismos cultivados en CYA, CP = componente principal	50
Tabla 7 Diámetro de los hongos en medios CYA, MEA, G25N, YES y DG18, medidos del 5to al 7mo día de incubación a 25°C	74

RESUMEN

La postcosecha y procesamiento del café pueden crear condiciones favorables de temperatura y humedad para el desarrollo de hongos, lo que puede afectar la calidad del producto. Algunos hongos del género *Penicillium* son capaces de producir micotoxinas, como la ocratoxina A (OTA), que pueden tener efectos negativos para la salud. En ese sentido, se evaluó el efecto de granos de café infectados con *Penicillium* no toxigénico (PNT) y *Penicillium* toxigénicos (PT1 y PT2) sobre el perfil volátil de la bebida de café y del grano verde. Para determinar el potencial toxigénico de los aislados, estos fueron sembrados en medio agar coco (CAM). Además, los granos de café fueron esterilizados por calor húmedo para garantizar el crecimiento de solamente los hongos inoculados en el grano y asegurar que los volátiles emitidos correspondan a la cepa evaluada o interacción de ella. Los compuestos orgánicos volátiles (COV) fueron determinados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), encontrando un total de 131 COV en la bebida de café, de ellos el compuesto 4-(5-metil-2-furanyl)-2-butanona podría ser considerado como un marcador químico de la presencia de *Penicillium* no toxigénico en esta matriz. En los granos verdes se encontró 116 COV, donde el 4-etenil-1,2-dimetoxi-benceno y el (R)-(+)-3-metilciclopentanona serían considerados como posibles marcadores químicos de la presencia de *Penicillium* no toxigénico en los granos verdes de café.

Palabras-clave: *Penicillium*, marcador químico, GC-MS, COV.

ABSTRACT

Postharvest and processing of coffee can create favorable temperature and wet conditions for the development of fungi, which can affect the quality of the product. Some fungi of the genus *Penicillium* can produce mycotoxins, such as ochratoxin A (OTA), which can have negative health effects. In this sense, the effect of coffee beans infected with non-toxicogenic *Penicillium* (PNT) and toxicogenic *Penicillium* (PT1 and PT2) on the volatile profile of the coffee beverage and the green bean was evaluated. To determine the toxicogenic potential of the isolates, they were inoculated into coconut agar medium (CAM). In addition, the coffee beans were sterilized by moist heat to guarantee the growth of only the fungi inoculated in the beans and to ensure that the volatiles emitted correspond to the evaluated strain or its interaction. Volatile organic compounds (VOC) were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), finding a total of 131 VOCs in the coffee beverage, including the 4-(5-methyl-2-furanyl)-2-butanone compound that could be considered as a chemical marker of the presence of non-toxicogenic *Penicillium* in this matrix. In the green beans, 116 VOCs were found, where 4-ethenyl-1,2-dimethoxy-benzene and (R)-(+)-3-methylcyclopentanone would be considered as possible chemical markers of the presence of non-toxicogenic *Penicillium* in the green beans of coffee.

Keywords: *Penicillium*, chemical marker, GC-MS, VOC.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de café (*Coffea arabica*) es una de las actividades agrícolas más importantes de la selva amazónica del Perú (Pérez-Escalante et al., 2021) correspondiéndole alrededor del 9% del PBI agrícola del país (Vargas et al., 2021). Durante las etapas postcosecha y procesamiento, los granos de café pueden contaminarse con hongos que afectan la calidad y sabor del producto (Maman et al., 2021; Viegas et al., 2017). Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos toxigénicos generalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Aguilar-Alvarez et al., 2021; Murthy et al., 2019). La principal micotoxina encontrada en el café es la ocratoxina A (OTA). La OTA puede generar efectos negativos a la salud por ser considerada nefrotóxica, inmunosupresora, teratogénica y carcinogénica (Aguilar-Alvarez et al., 2021). Además, cuando los granos de café están contaminados por OTA, es difícil eliminarla, incluso en el proceso del tostado, por tener una estructura química muy estable (Maman et al., 2021; Pitt & Hocking, 2022). No obstante, la Unión Europea en 2006 (No. 1881/2006) estableció límites máximos permitidos de OTA en café tostado en grano y café tostado molido de 5 µg/kg y de 10 µg/kg para café soluble o instantáneo (Paterson et al., 2014).

Los hongos filamentosos del género *Penicillium* son capaces de producir una gran cantidad de enzimas que podrían ser utilizadas para el procesamiento de productos alimenticios (Meena et al., 2020). Algunas especies como *P. brevicompactum* producen aromas deseables en el procesamiento de café, mientras que otras como *Penicillium* sp. nov. originan notas negativas (Iamanaka et al., 2014). La posibilidad de la generación de características organolépticas negativas, así como su producción de micotoxinas, hacen que el uso de especies de *Penicillium* en el procesamiento de alimentos sea limitado (Meena et al., 2020). El aroma y sabor del café están formados por una mezcla compleja de alrededor de trescientos compuestos orgánicos volátiles (COV), incluyendo principalmente los hidrocarburos alifáticos, compuestos de azufre, pirazinas, piridinas, oxazoles, pirroles, furanos, aldehídos, ésteres, alcoholes, cetonas y fenoles (Borém et al., 2021). Los compuestos se caracterizan por su capacidad de producir notas sensoriales positivas y negativas al café.

Los COV son mezclas de compuestos orgánicos (cadena de carbono) capaces de volatilizarse y pueden ser producidos por microorganismos como los hongos, y se difunden fácilmente a través del ambiente, de la atmósfera y del suelo, debido a su

pequeño tamaño y bajo peso molecular (Kumar et al., 2021). El análisis de los COV de café se puede realizar utilizando una gran variedad de técnicas analíticas. Sin embargo, la microextracción en fase sólida (SPME) es un método relativamente reciente que tiene la ventaja de requerir pequeñas porciones de muestra y la extracción de los COV liberados en el espacio de cabeza es efectiva, sin generar residuos tóxicos al dispensar solventes orgánicos. Al combinar la SPME con la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) se obtiene una técnica confiable para el análisis de COV liberados de matrices alimentarias (Caporaso et al., 2018).

En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la infección de granos de café con aislados toxigénicos y no toxigénico del género *Penicillium* en el perfil de COV del grano verde y de la bebida de café en el perfil de compuestos orgánicos volátiles, con foco en la identificación de un marcador químico de la contaminación por estos microorganismos.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Lugar de ejecución

Los ensayos con los microorganismos, así como el procesamiento del café y la preparación de la bebida, se realizaron en el área de la Clínica Fitopatológica del Laboratorio de Investigación de Sanidad Vegetal (LABISANV). Los análisis cromatográficos fueron realizados en el Área de Cromatografía de Gases del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOVEG). Ambos laboratorios pertenecen al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A).

2.2 Material de estudio

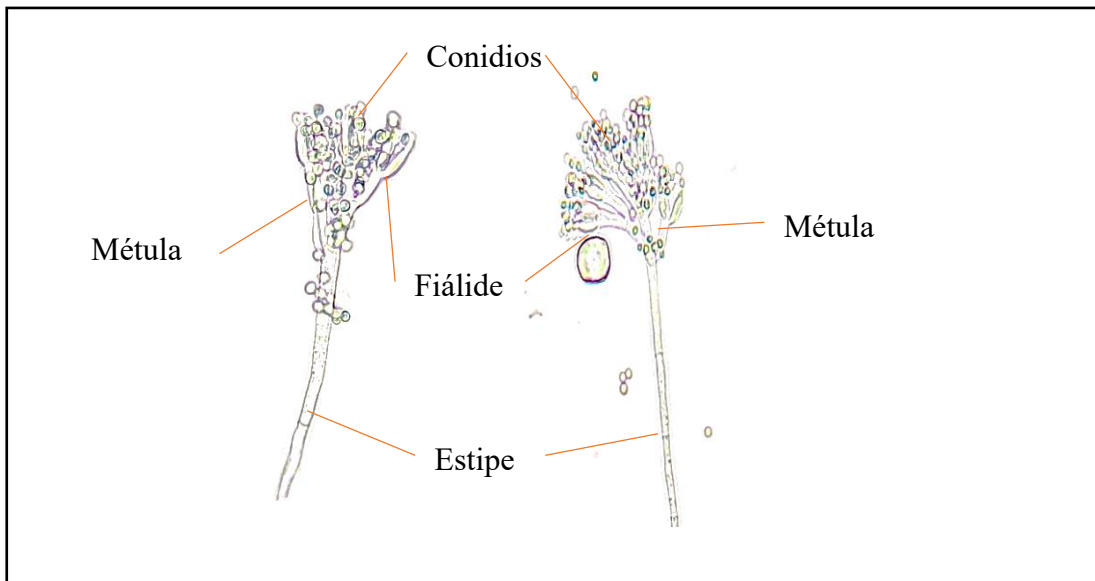
Café (*Coffea arabica*), de la variedad Catimor, procedentes del caserío Ortiz Arrieta, distrito de Lonya Grande, provincia de Utcubamba, departamento Amazonas. La muestra de 6 kg se mezcló sobre una mesa y las impurezas identificadas fueron retiradas. Los granos fueron divididos en submuestras de 500 g, en bolsas de polietileno con cierre hermético, y conservados a -20 °C. La obtención de los microorganismos y evaluación de sus características están descritas a continuación.

2.3 Caracterización morfológica de *Penicillium*

Con el fin de evaluar las características biológicas de los aislados de *Penicillium*, estos fueron sembrados en tres puntos equidistantes en placas de Petri conteniendo agar Czapek extracto de levadura (CYA), agar extracto de malta (MEA), agar glicerol al 25% y nitrato (G25N), DG18 y agar extracto de levadura sacarosa (YES) e incubados a 25 °C durante 7 días. En el medio CYA se incluyeron réplicas incubadas a 5 °C y 37 °C. El diámetro de las colonias fue registrado y se describió la forma, textura y colores del anverso y reverso de las placas de Petri. Las observaciones microscópicas fueron realizadas con montajes del hongo de 7 días de edad. Para ello, se utilizó alcohol 70%, para dispersar las esporas, y ácido láctico, para visualizar el color real de las estructuras. Las características observadas, como los patrones de ramificación de conidióforos, la forma y tamaño de los conidios y fiálide, fueron utilizadas para su clasificación, según las claves dicotómicas descritas por Pitt y Hocking (2009) y Samson et al. (2010).

Figura 1

Estructura morfológica del conidióforo de Penicillium



Nota. Adaptado de Samson et al. (2010) usando micrografías del *Penicillium* no toxigénico (izquierda) y del *Penicillium* toxigénico 1 (derecha).

2.4 Obtención de cultivos monospóricos

Para obtener un cultivo puro se siguió la metodología de Alfenas y Mafia (2007). Una masa de esporas se transfirió a una gota de 20 μL de agua destilada con polisorbato 20 (Tween® 20) al 0.05%, depositada preliminarmente de forma aséptica en la superficie del medio agar agua sólido contenido en una placa de Petri. La siembra se realizó mediante la técnica de estriado, arrastrando las esporas fúngicas en zigzag. Las placas se incubaron a 25 °C y, 24 h después, cuando las esporas ya habían germinado, se realizó el corte y la transferencia de la punta de hifa de una espora hacia otra placa de Petri con medio CYA (Figura 22, en anexo). Las placas se incubaron a 25 °C por 5 días. Todo este proceso fue repetido nuevamente para garantizar la obtención de las colonias puras. Los aislados fueron conservados a 5 °C, a corto y mediano plazo, en microtubos de polipropileno de 1.5 mL de capacidad conteniendo agar semilíquido (Tween® 20 al 0.05% y agar-agar al 0.2%).

2.5 Análisis de la producción de micotoxinas

Los aislados de *Penicillium* fueron sembrados en el medio agar coco (CAM, pH 6.9) e incubados a 30 °C durante 5 días. Las cepas que presentaron fluorescencia en el reverso de las colonias al ser expuestas a luz ultravioleta (UV), a una longitud de onda de 366 nm (Faria et al., 2017; Maman et al., 2021), fueron consideradas como productoras de micotoxinas. Estas podrían ser aflatoxinas, ocratoxinas (Pitt & Hocking, 2022) o citrinina (Mohamed et al., 2013). Este proceso fue realizado para confirmar la capacidad de los aislados para producir toxinas, ya que las cepas fueron aisladas y evaluadas en investigaciones anteriores (Davila-Garcia, 2023; Gaslac-Culqui, 2022).

2.6 Humedad de los granos de café verde

Para tener registro de las condiciones de los granos de café verde a ser inoculados, se determinó el contenido de humedad. El procedimiento seguido fue el descrito por Sualeh et al. (2020), con algunas modificaciones. Dos gramos de los granos verdes de café pilados manualmente y molidos en molino eléctrico de la marca Bosch fueron pesados en papel aluminio. Las muestras fueron secadas en estufa a 136 °C por una hora. Luego, enfriaron en una campana desecadora para no absorber humedad del ambiente y fueron pesadas. Este proceso se repitió dos veces por un tiempo de 30 min a 136 °C, hasta alcanzar peso constante. La pérdida de peso fue representada como la pérdida de humedad, expresada en porcentaje. Las muestras fueron analizadas por triplicado. La humedad fue calculada de acuerdo con la ecuación 1:

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i - P_p} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

P_i : peso inicial (g) de la muestra

P_f : peso final (g) de la muestra

P_p : peso del papel (g) aluminio

2.7 pH de los granos de café verde

Para tener registro de las condiciones del sustrato a ser inoculado y verificar posibles cambios en los granos por causa de la esterilización por calor húmedo, se realizó la determinación del pH mediante la metodología propuesta por Gebrekidan et al. (2019).

Para ello, 20 g de las muestras piladas y molidas de café verde esterilizado y de café verde sin esterilizar fueron mezcladas con 100 mL de agua destilada. Después de homogenizar, se dejó sedimentar por 30 min. La lectura del pH de las muestras se realizó a temperatura ambiente utilizando un potenciómetro digital (Thermo Scientific, modelo Orion Star A215). Las muestras se analizaron por triplicado.

2.8 Conteo de esporas

Colonias de 10 días de crecimiento sembradas en medio CYA e incubadas a 25 °C fueron utilizadas para preparar la solución de suspensión de esporas. Para ello, todos los materiales y reactivos utilizados fueron autoclavados a 121 °C por 15 min. Se añadió 30 mL de una solución de Tween® 20 al 0.05% sobre la colonia y con la ayuda de una espátula de Drigalsky se raspó suavemente la superficie de la colonia para soltar las esporas. La suspensión de esporas fue filtrada a través de una gasa estéril para obtener un filtrado de esporas con pocas impurezas como hifas. Para obtener la concentración de esporas requerida mayor a 10^6 esporas.mL⁻¹, se realizó una dilución con 0.5 mL de la suspensión de esporas más 9.5 mL del mismo solvente en un tubo de ensayo con tapa de rosca de 10 mL. El tubo fue agitado con vortex a 2000 rpm por 20 s. Se agregó una gota de la suspensión de esporas en cada recuadro de la cámara de Neubauer, se tapó con la lámina cubreobjetos y se realizó el conteo de esporas en el microscopio de luz. Para calcular el número de esporas inoculadas se utilizó la ecuación 2 (Alfenas & Mafía, 2007) y los cuadrantes utilizados para el conteo de las esporas en la cámara de Neubauer se puede ver en la Figura 2.III.

$$\left[\left(\left(\frac{C1 + C2 + C3 + C4 + C5}{5} \right) 2.5 \right) 10^5 \right] = \frac{\text{esporas}}{\text{mL}} \quad (2)$$

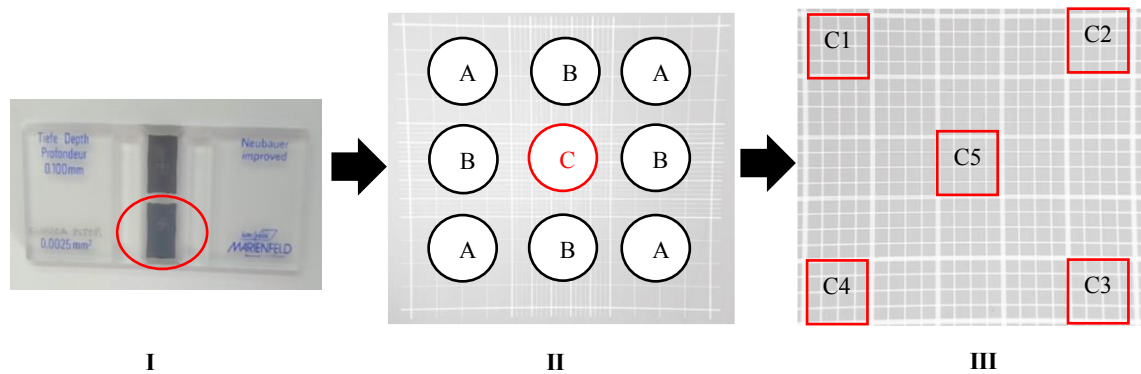
2.9 Inoculación de granos de café con aislados de *Penicillium*

Los granos fueron esterilizados por calor húmedo a 121 °C por 15 min y secados en estufa a 37 °C durante 48 h. En seguida, fueron distribuidos en porciones de 180 g en matraces de Erlenmeyer. Los granos de café esterilizados fueron inoculados con 2.4 mL de 1.21 , 1.06 y 1.03×10^6 esporas.mL⁻¹ de suspensión de esporas de *Penicillium* no toxigénico, *Penicillium* no toxigénico 1 y *Penicillium* no toxigénico 2, respectivamente (Tabla 3). Seguidamente, 3.6 mL de agua destilada estéril fueron adicionados a cada matraz para

aumentar la actividad de agua (A_w) de la muestra y favorecer el crecimiento fúngico. En la muestra control, el inóculo fue remplazado por el mismo volumen (2.4 mL) de Tween® 20 al 0.05%. Todos los matraces fueron incubados por 7 días a 25 °C (Iamanaka et al., 2014).

Figura 2

Cuantificación de esporas, (I) Cámara de Neubauer, (II) Cuadrantes con aumento de 40X y (III) con aumento de 400X indicando los 5 cuadrantes donde se realizó el conteo



2.10 Tostado y molido de los granos de café

Los granos verdes de café inoculados y sin inocular fueron pilados manualmente y separados en matraces de Erlenmeyer de 100 mL con el orificio cubierto con papel de aluminio. Los matraces fueron introducidos a la estufa a 220 °C y fueron mantenidos allí a esta temperatura por 35 min. Los granos fueron molidos en un molino eléctrico de la marca Bosch y pasados por un tamiz con malla de 850 μ m para estandarizar el tamaño de la partícula.

2.11 Preparación de la bebida de café

La bebida fue preparada de acuerdo al método de filtrado descrito por Sanchez y Chambers (2015), con modificaciones. Sobre un embudo forrado con papel filtro se depositó 5.8 g de cada muestra tostada y molida y sobre ella fue vertida 100 mL de agua destilada calentada hasta el punto de ebullición alcanzado a los 92 °C.

2.12 Análisis de COV de la bebida de café

En un vial de 20 mL se adicionó 0.4 g de cloruro de sodio seguido de 5 mL de la bebida filtrada de café. El vial fue cerrado herméticamente con una tapa de aluminio y septa de PTFE / silicona y, en seguida, agitado durante 15 s en un agitador programado a 2000 rpm. El cloruro de sodio fue utilizado para promover la liberación de más compuestos orgánicos volátiles (COV) de la fase líquida en el espacio de cabeza o fase gaseosa (Thammarat et al., 2018).

El vial fue colocado en un termobloque a 60 °C por 15 min para alcanzar el equilibrio entre la fase sólida (muestra) y gaseosa (espacio de cabeza). La extracción de los COV fue realizada por microextracción en fase sólida (SPME), utilizando la fibra Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). La fibra fue expuesta directamente al espacio de cabeza para la extracción de los COV por un tiempo de 30 min, a la misma temperatura de equilibrio. Después de la adsorción, la fibra fue insertada directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases para la desorción térmica a 250 °C en modo splitless por 10 min (Budryn et al., 2011). La separación de los COV fue realizada en una columna capilar DB-5MS UI (60 m de largo \times 250 μ m diámetro interno \times 1 μ m espesor del film de relleno). Se utilizó helio como gas de arrastre con un flujo de 1.0 mL.min⁻¹. La programación del horno fue inicialmente de 35 °C por 5 min, subiendo 4 °C.min⁻¹ hasta 250 °C y fue mantenida por 16 min. Las temperaturas de la fuente de iones y del detector de masas (cuadrupolo) fue de 280 °C y 150 °C, respectivamente. El espectrómetro de masas registró la corriente iónica total (70 eV) en un rango de masa de 35 a 500 amu (unidad atómica de masa, del inglés, *atomic mass units*) con modo scan de 1562 amu.s⁻¹. Los análisis fueron realizados por triplicado.

2.13 Análisis de COV de los granos de café verde

Los granos de café verde fueron molidos con nitrógeno líquido. En un vial de 20 mL fueron depositados dos gramos y luego cerrado herméticamente. Para extraer los COV también se utilizó la SPME (Bertrand et al., 2012). Las condiciones de extracción, inyección, separación y detección fueron las mismas indicadas en el ítem 2.12. Los análisis fueron realizados por triplicado.

2.14 Análisis de COV producidos por los microorganismos

Los microorganismos fueron sembrados en medio CYA estéril en plano inclinado en viales de 20 mL. El vial fue cerrado herméticamente e incubado a 25 °C por 7 días. La extracción de los COV fue a través de la SPME. El vial fue colocado en un termobloque a 25 °C por 15 min y, utilizando la misma fibra mencionada anteriormente, se extrajeron los COV por 30 min. Pasado el tiempo de adsorción, la fibra fue insertada en el puerto de inyección del GC para la desorción térmica a 270 °C en modo splitless por 5 min. Se utilizó la columna capilar mencionada (DB-5MS UI). La corrida fue de 45 min y la temperatura del horno empezó en 40 °C y subió a un rango de 5 °C.min⁻¹ hasta 250 °C en donde se mantuvo por 3 min. El helio fue utilizado con un flujo de 1.0 mL.min⁻¹. Las temperaturas de la fuente de iones y del detector de masas (cuadrupolo) fue, respectivamente, de 280 °C y 150 °C. El espectrómetro de masas registró la corriente iónica total en un rango de masa de 10 a 700 amu con modo scan de 1562 amu.s⁻¹. Los análisis fueron realizados por triplicado.

2.15 Identificación de compuestos orgánicos volátiles

Los COV fueron identificados por la comparación de los espectros de masa de la muestra con la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (Biblioteca NIST 17). La identidad de los compuestos fue confirmada por la inyección del estándar de n-alcenos (C₁₀ a C₄₀) y la comparación de sus índices de retención.

2.16 Análisis de datos

Debido al gran número de tratamientos, estos serán designados con siglas a lo largo del texto. Las descripciones detalladas se presentan en la Tabla 1. Los COV de todos los tratamientos fueron considerados en los resultados tal cual fueron identificados. Existe una excepción en el caso de los COV de los tratamientos PNT-CYA, PT1-CYA y PT2-CYA, donde se filtraron los COV encontrados en CYA con el software Unknowns Analysis, porque estos no eran de interés para la presente investigación, estando el enfoque sólo en los volátiles producidos por *Penicillium* y no en el medio en el que fueron cultivados.

Tabla 1

Codificación de los tratamientos con la descripción de las variables consideradas para la determinación del perfil de COV en el café inoculado con cepas de Penicillium

Factor 1: <i>Penicillium</i> (P)	Factor 2: Sustrato	Bebida de café (BC) preparada con grano verde esterilizado y tostado	Grano verde (GV) esterilizado de café	Medio de cultivo CYA
No toxigénico (NT)		PNT-BC	PNT-GV	PNT-CYA
Toxigénico 1 (T1)		PT1-BC	PT1-GV	PT1-CYA
Toxigénico 2 (T2)		PT2-BC	PT2-GV	PT2-CYA
Sin inoculación		BC	GV	CYA

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de humedad y el pH de GV esterilizado y GV sin esterilizar, luego de confirmar y cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de los residuos para cada variable observada.

Con la finalidad de recoger la mayor parte de la información o variabilidad de los datos, así como identificar grupos uniformes o atípicos de informaciones observadas se realizó un análisis de componentes principales (ACP), técnica del análisis multivariado que sirve para estudiar las relaciones que se presentan entre las variables correlacionadas (COV) y transformar a un conjunto de nuevas variables correlacionadas entre sí llamadas componentes principales o dimensiones. El ACP fue realizado para todos los tratamientos, pero de forma independiente para cada sustrato (ver Tabla 1). En todos los casos se consideraron las dos primeras dimensiones. Al ser la suma de los porcentajes de variabilidad superior a 80%, esas dos dimensiones fueron suficientes como información fiable de la explicación de la variabilidad de los datos. Asimismo, se realizó un análisis de clúster jerárquico, que también es una técnica del análisis multivariado que se basa en la similitud entre sus observaciones. Esto generó cuatro, cuatro y dos agrupamientos de los COV para cada sustrato, respectivamente. Todas las variables fueron estimadas por triplicado y los datos fueron analizados con el software R (R Development Core Team, 2020).

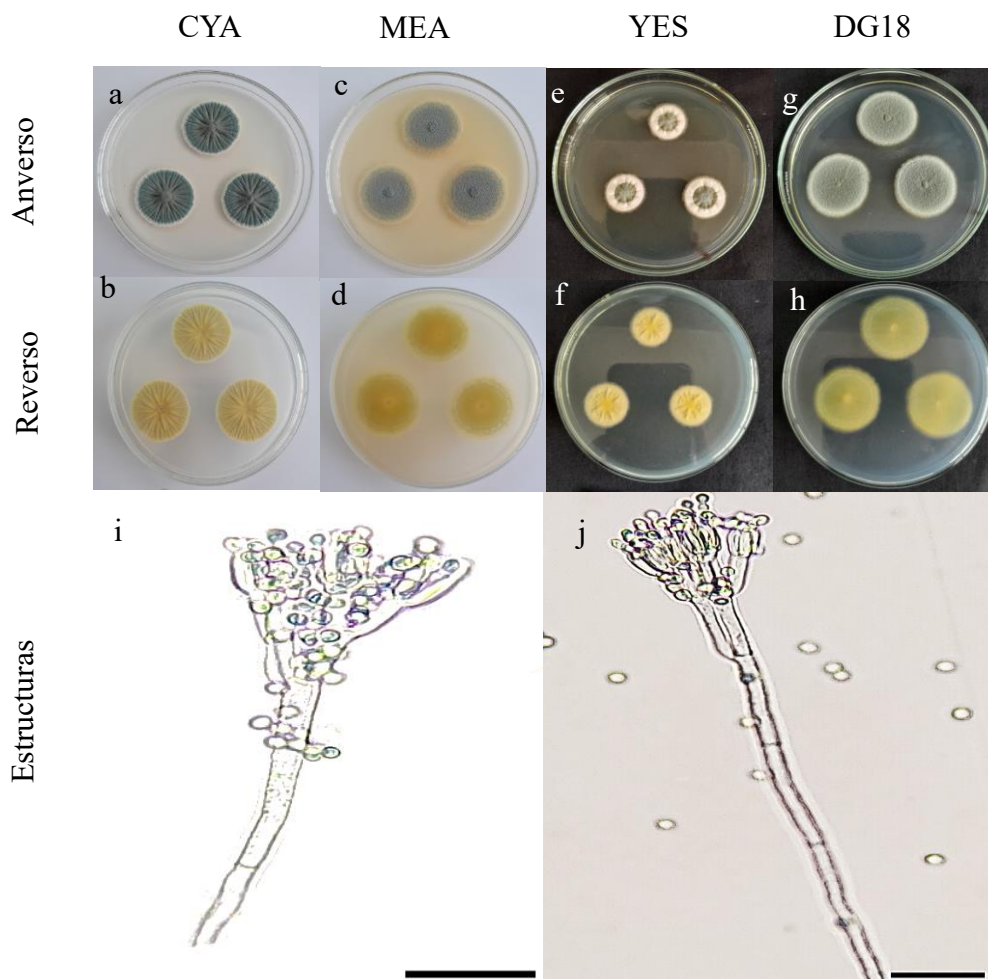
III. RESULTADOS

3.1. Caracterización morfológica de los aislados de *Penicillium*

En la Figura 3 se observan las características macroscópicas de las colonias de *Penicillium* no toxigénico en medio CYA, que midió 26-29 mm de diámetro. Las colonias eran radialmente surcadas, densas, relativamente bajas, velutinosas, granulares o menos flocosas y el micelio usualmente discreto, blanco, con producción moderada de conidios a intensa, siendo los conidios amarillo-verdosos, generalmente cerca del verde petróleo, sin exudado presente. El reverso de la colonia presentaba tonos de amarillo pálido.

Figura 3

Apariencia macroscópica de Penicillium no toxigénico en diferentes medios de cultivo (a hasta h) y conidióforos (i, j), incubados a 25 °C por 7 días, barras = 20 μm



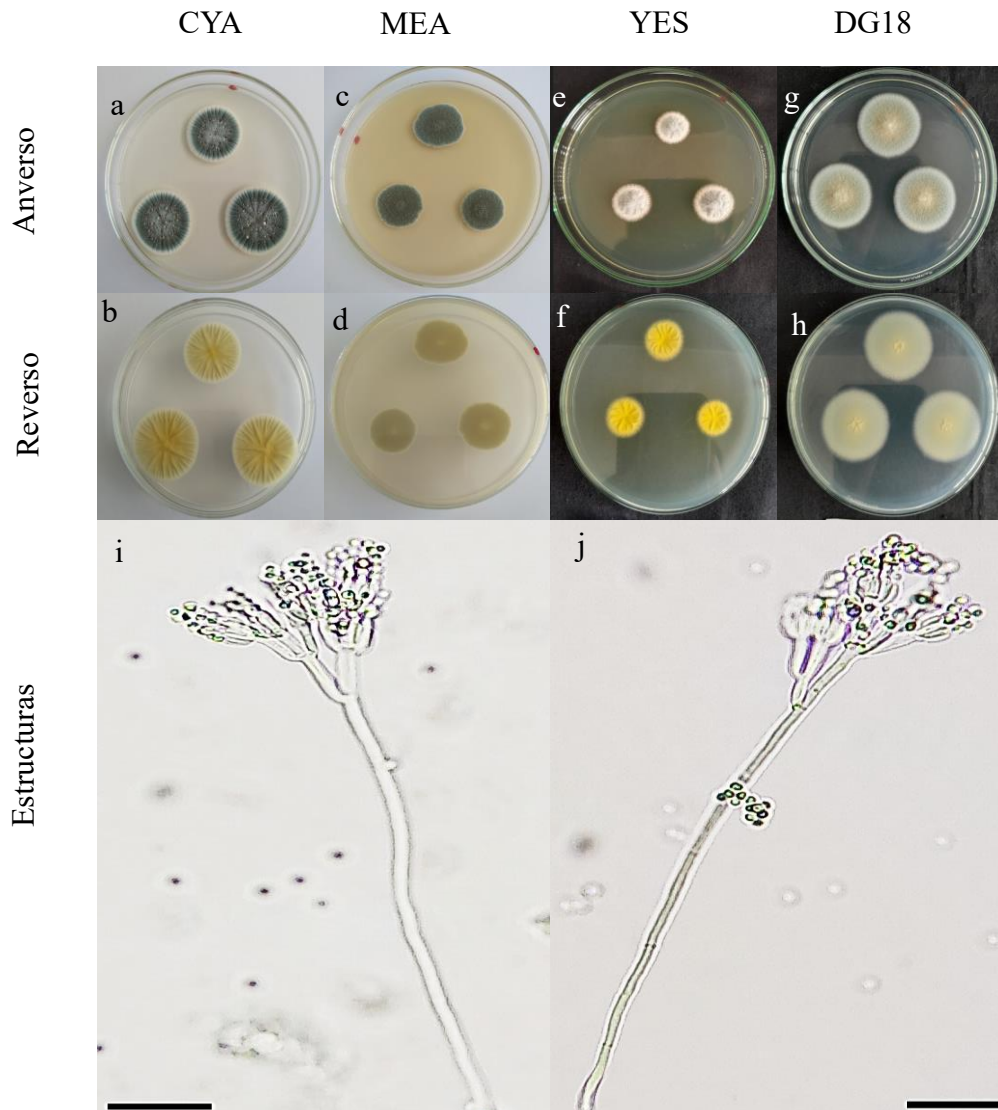
En medio MEA presentó un diámetro de 30-33 mm, de características planas, velutinosas a granulares o centralmente flocosas, micelio blanco o marrón y con producción moderada de conidios de color amarillo verdoso. El reverso de la colonia presentaba tonos de amarillo verdoso. En medio G25N, alcanzó un crecimiento de 24-27 mm de diámetro. Las colonias eran planas o finamente surcadas radialmente, densas, centralmente flocosas o granulares y con producción de conidios azul grisáceo, amarillo verdoso o pardo. El reverso de la colonia mostró tonos de amarillo pálido a verde amarillento, con bordes blanquecinos. En medio YES las colonias fueron de crecimiento lento (19-24 mm de diámetro), ligeramente surcadas, velutinosas, presentaban un color verde petróleo con bordes amplios blancos. El reverso de la colonia fue en tonos de amarillo blanquecino. En medio DG18, las colonias eran de crecimiento vertiginoso, de 30-32 mm de diámetro, de color verde grisáceo, levemente flocosas centralmente. El reverso de la colonia fue en tonos de verde amarillento. No presentó crecimiento a 5 y 37 °C en medio CYA (micrografías no presentadas). Las colonias presentaron conidióforos nacidos de hifas superficiales o subterráneas. Los estipes midieron de 70-200 μm de largo, en su mayoría eran terverticilados y en ocasiones diverticilados, generalmente con paredes rugosas. Las métulas eran de 8-29 \times 1.4-4.4 μm . Las fiálides fueron lectiformes de 1.5-3.6 \times 8-15 μm de largo. Los conidios fueron subesferoidales a elipsoidales de 2 - 4 μm de largo, con paredes lisas o finamente rugosas, soportadas en cadenas desordenadas.

En la Figura 4 se observan las características macroscópicas de las colonias de *Penicillium toxigénico* 1. En medio CYA alcanzó diámetros de 26-28 mm, produciendo conidios de color verde puro. Las colonias fueron velutinosas a granulares, de tono gris (centro de la colonia) a verde petróleo, micelio blanco con grandes gotas de exudado transparente. El reverso de la colonia presentó tonos de amarillo pálido. En MEA, la colonia tuvo 19-22 mm de diámetro, las colonias fueron planas, de color verde petróleo, con un reverso de color amarillo verdoso pálido. En G25N, de 22-25 mm de diámetro, colonias flocosas, sulcadas centralmente, en el centro presentó un color blanco grisáceo, seguido de un verde grisáceo con bordes blancos. El reverso de la colonia era de tonos de verde pálido. En YES el grado de esporulación fue débil y su crecimiento fue lento (diámetro 15-19 mm). El color del reverso de la colonia presentó tonos de amarillo claro. En DG18, colonias de 29-31 mm de diámetro, planas, ligeramente flocosa en el centro, con una cloración desde marrón amarillento a verde petróleo. El reverso de la colonia era desde un color verde

amarillento a verde pálido. A 37 °C se observó un crecimiento macroscópico (Figura 23- Anexos) de 8–11 mm de diámetro y a 5 °C se registró crecimiento de la colonia.

Figura 4

Apariencia macroscópica de Penicillium toxigénico 1, en diferentes medios de cultivo (a hasta h) y conidióforos (i, j), incubados a 25 °C por 7 días, barras = 20 μm

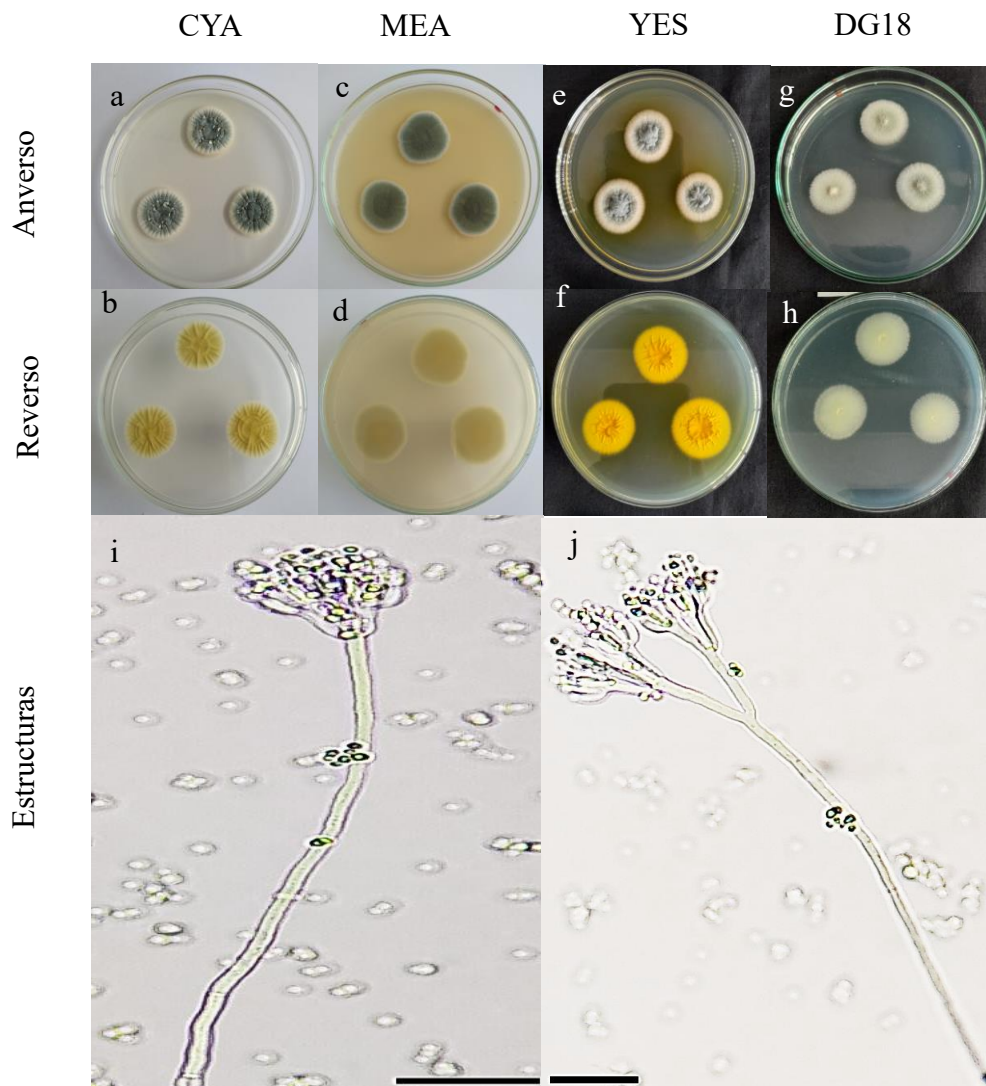


Las características microscópicas de este aislado fueron de conidióforos nacidos de hifas subsuperficiales y eran terverticilados. Estipes de 120-350 μm de largo con paredes lisas. Métulas cilíndricas de 11-35 × 1.8-3.8 μm, con 5-8 fiálides. Fiálides cilíndricas que se estrechan hasta un cuello definido, midiendo de 5-18 μm de largo × 1.3-2.8 μm de ancho. Conidios globosos a subglobosos de 1.3 - 4.4 μm de diámetro en tonos verdosos y de paredes lisas.

Las características macroscópicas de *Penicillium toxigénico* 2 se muestran en la Figura 5. En agar CYA, las colonias median de 23–29 mm de diámetro, con características granulares a fasciculadas y grandes gotas de exudado transparente. Los conidios fueron de color verde grisáceo a verde opaco. El reverso de la colonia era amarillo grisáceo. A 37 °C se observó un crecimiento de 11-14 mm de diámetro y a 5 °C no hubo crecimiento. En MEA presentó diámetro de 19-23 mm, con colonias planas u ocasionalmente surcadas radialmente, velutinosas a granulares o centralmente flocosas y micelio blanco.

Figura 5

Apariencia macroscópica de Penicillium toxigénico 2, en diferentes medios de cultivo (a hasta h) y conidióforos (i, j), incubados a 25 °C por 7 días, barras = 20 μm



La formación de conidios, de colores amarillo verdosos, fue moderada. El reverso de la colonia presentó tonos de amarillo blanquecino débil. En G25N la colonia tuvo crecimiento lento, de 17-21 mm de diámetro, levemente surcadas radialmente, flocosas en el centro, presentó un color verde petróleo con bordes blancos. El reverso de la colonia tenía un amarillo intenso a un verde amarillento. En medio YES las colonias tuvieron 24-27 mm de diámetro, con características surcadas, flocosas, velutinosas y con micelio blanco. El reverso de la colonia presentó un color amarillo intenso. En agar DG18 la colonia era flocosa en el centro, exhibiendo una coloración de verde grisáceo a verde blanquecino, con un crecimiento de 24-16 mm de diámetro. El reverso de la colonia fue verde amarillento pálido. A 37 °C se observó un crecimiento macroscópico (Figura 23-Anexos) de 10–13 mm de diámetro y a 5 °C se registró crecimiento de la colonia. Las características microscópicas observadas fueron conidióforos nacidos de hifas subsuperficiales, generalmente terverticilados. Los estipes presentaron paredes rugosas de 145-165 μm de largo, con paredes finas a visiblemente rugosas. Las métulas tenían forma cilíndrica de 9-21 μm \times 1.3-2.9 μm , de largo y de ancho, con 5-8 fiálides. Las fiálides cilíndricas se estrechan, midiendo de 6-9 μm \times 1.4-2.8 μm , de largo y de ancho y los conidios eran globosos a subglobosos con 1.4-3.4 μm de diámetro, con paredes lisas y una coloración en tonos verdosos.

3.2. Análisis de producción de micotoxinas

En la Figura 6 se observa la ausencia (Figura 6a) y la presencia de fluorescencia (Figura 6b y 6c) alrededor de las colonias de los hongos, lo que indica el potencial para la producción de aflatoxinas, ocratoxinas (Pitt & Hocking, 2022) o citrinina (Mohamed et al., 2013).

3.3. Determinación del porcentaje de humedad y pH de los granos de café

La Tabla 2 muestra el porcentaje de humedad y el pH de los granos de café esterilizados y sin esterilizar donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Los resultados del contenido de humedad y pH de los granos verdes esterilizados y sin esterilizar presentan un coeficiente de variación del 5.91 y 0.91%, respectivamente, indicando la homogeneidad de los datos entre sí, lo mismo que demuestra la prueba de Bartlett al 5% de significancia, considerándolos homocedásticos. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk al 5% de significancia, considera a los residuos como normales. Según la prueba F, las medias no son distintas ($p > 0.05$).

Figura 6

Fluorescencia de cepas de *Penicillium* en medio CAM bajo luz UV, incubados por 5 días a 30 °C

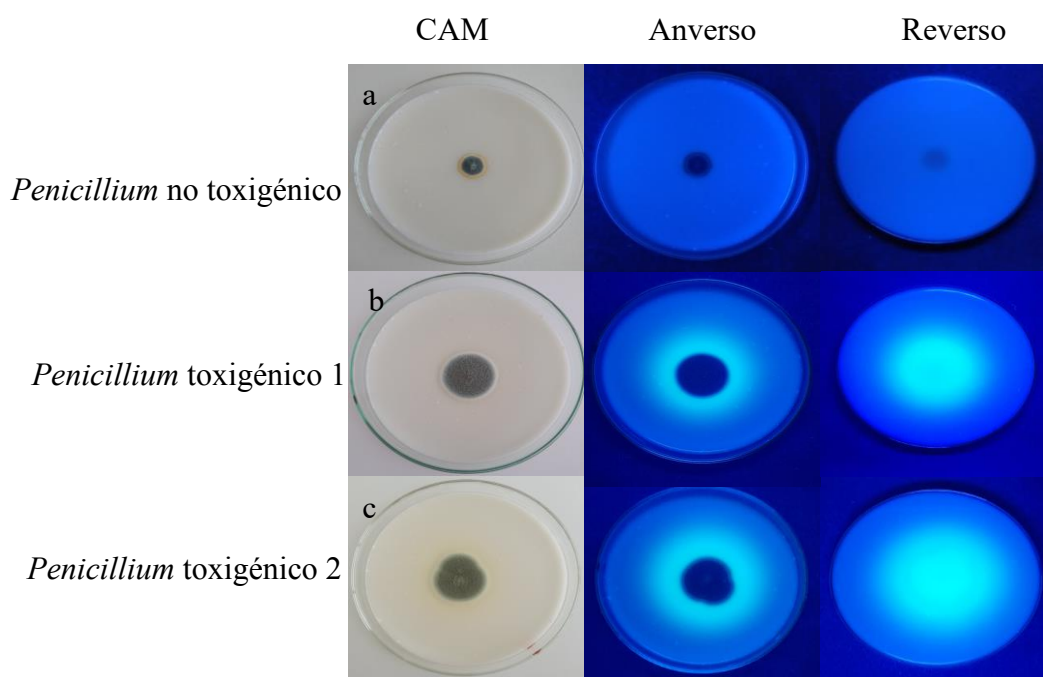


Tabla 2

Efecto del procedimiento de esterilización por autoclavado en la humedad y el pH de granos verdes de café

	Tratamientos	Promedio	Desviación estándar	Error estándar
Porcentaje de Humedad	GSE	12.6	0.17	0.098
	GE	13.7	1.09	0.627
pH	GSE	5.8	0.01	0.007
	GE	5.8	0.06	0.033

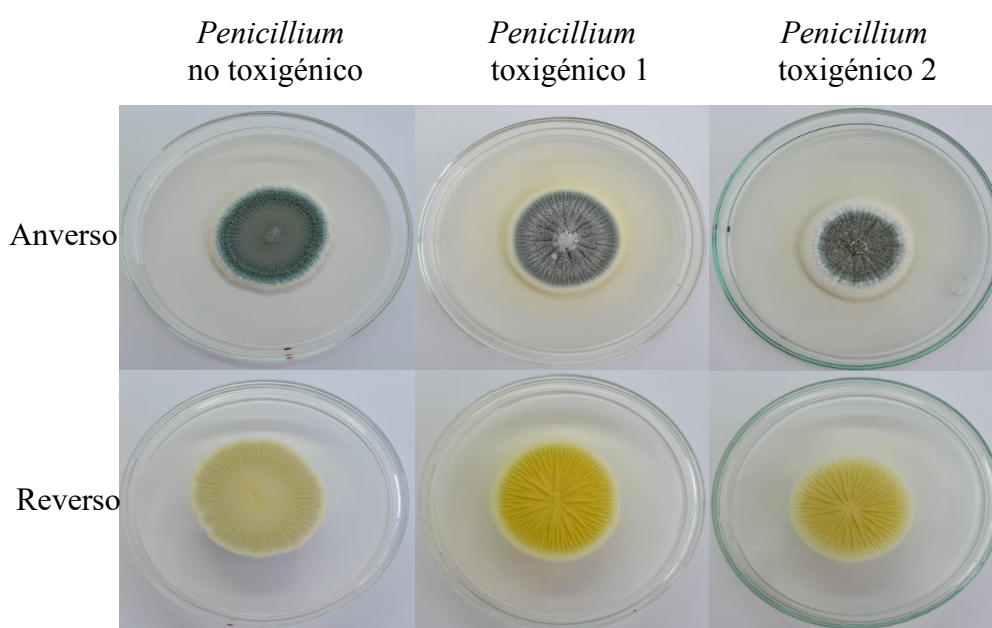
Nota. Granos sin esterilizar (GSE), Granos esterilizados (GE). Los resultados no fueron considerados estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), según la prueba de F

3.4. Calibración de esporas e inoculación de granos con esporas de *Penicillium*

En la Figura 7 se observan las colonias utilizadas para la preparación de las suspensiones de esporas para las inoculaciones de los granos de café. Aunque las colonias no llegaron a cubrir la superficie del medio de cultivo, produjeron suficientes esporas.

Figura 7

Cepas de Penicillium en medio CYA, incubadas a 25 °C por 10 días para la obtención de suspensión de esporas



La Tabla 3 presenta el conteo de esporas realizado para verificar la calibración de inóculo a una concentración de 1×10^6 esporas.

Tabla 3

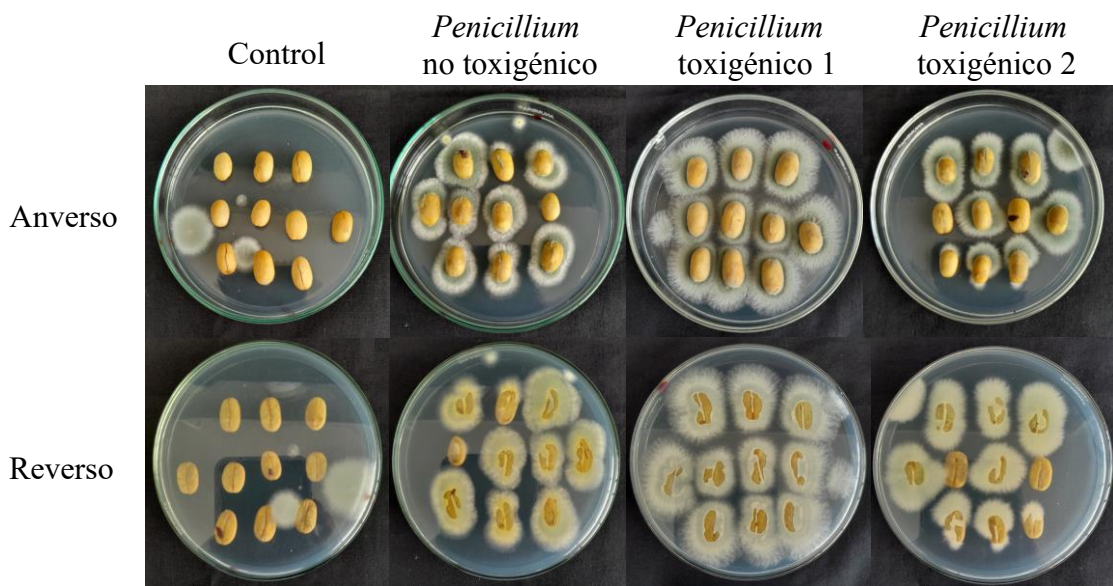
Concentración de esporas. mL⁻¹ de cepas de Penicillium utilizadas para inocular granos de café esterilizados

Lecturas	<i>Penicillium</i> no toxigénico	<i>Penicillium</i> toxigénico 1	<i>Penicillium</i> toxigénico 2
1	1.30×10^6	9.50×10^5	1.50×10^6
2	1.30×10^6	1.00×10^6	1.55×10^6
3	1.40×10^6	1.20×10^6	9.50×10^5
4	8.50×10^5	1.10×10^6	1.20×10^5
Promedio	1.21×10^6	1.06×10^6	1.03×10^6

En la Figura 8 se observan los granos de café autoclavados y sin inocular (control) y aquellos inoculados con los tres aislados de *Penicillium*, por separado. Es evidente que aparecieron colonias solamente a partir de los granos de los tratamientos inoculados y con un porcentaje mayor al 80%. En la muestra control, las colonias presentes son de hongos contaminantes y no se originaron de los granos sembrados.

Figura 8

Granos no inoculados (Control) e cepas de Penicillium sembrados en medio DG18 e incubados por 7 días a 25 °C

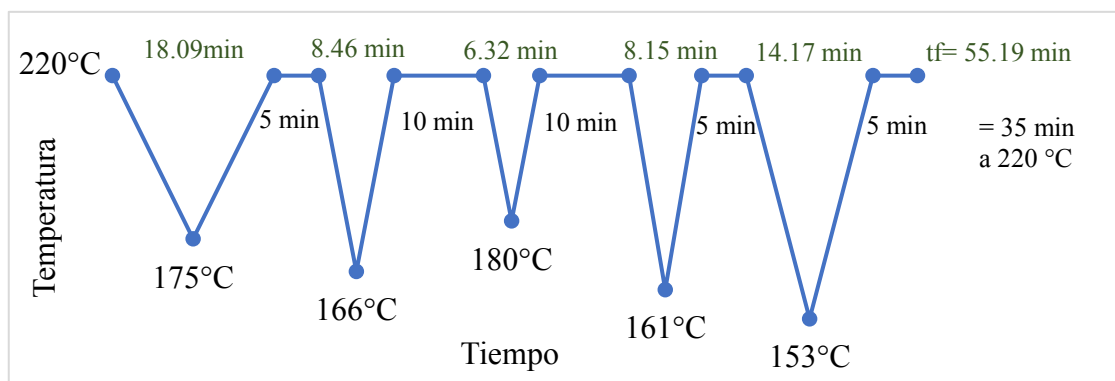


3.5. Tostado de granos de café inoculados y sin inocular

Las temperaturas y tiempos empleados en el tostado de los granos de café fueron registrados y pueden ser observados en la Figura 9.

Figura 9

Registro del tiempo y temperatura de tostado de granos verdes de café en estufa



Nota. Tiempo de fluctuación térmica (tf)

3.6. Compuestos orgánicos volátiles de la bebida de café

Antes de la realización de los análisis estadísticos se hizo una exploración de datos que puede ser observado en los diagramas de cajas (Figuras 26, 27, 28 y 29 – Anexos), siendo esto importante para conocer el comportamiento de los datos y de las variables (COV) en los tratamientos consistente en la bebida filtrada de café, PNT-BC, PT1-BC, PT2-BC y BC.

En la Figura 10 se observa comportamiento variable con relación a cada COV de la bebida del café, independiente de si fueron inoculados o no con microorganismos, en el que los compuestos acetato de 2-furanmetanol y 5-metil-2-furancarboxaldehído, presentan una mayor variabilidad frente a los demás. Existe presencia de valores atípicos como en los compuestos 2-etenil-5-metil-pirazina; óxido de trans-linalool (furanoides); 2-(2-propenil)-furano; 1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-etanona; diisobutirato de 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol; 2-isoamil-6-metilpirazina y 1-(2-piridinil)-1-propanona. Debido a esa variabilidad y valores atípicos los datos fueron estandarizados a través de la transformación de los datos aplicando la raíz cuadrada a los valores de abundancia (áreas) de los COV de la bebida. Seguidamente se realizó el análisis de componentes principales (ACP) y análisis clúster utilizando una matriz de correlaciones con los valores previamente transformados.

La Tabla 4 muestra los resultados del ACP para la bebida siendo que, con las dos primeras componentes, se explica el 82.68% de la variación de los COV detectados en todos los tratamientos de la bebida. La Figura 11, muestra gráficamente los resultados de los dos primeros componentes principales descritos en la Tabla 4, donde se identifica la importancia o contribución de aquellos COV que explican la variabilidad total de los datos.

Los dos componentes muestran evidencias significativas en las relaciones entre los COV y los tratamientos, con posibles agrupaciones de los compuestos sobre los tratamientos. Así, por ejemplo, existen evidencias de que los tratamientos BC y PNT-BC están alrededor de los compuestos que más contribuyen como el tridecano; 2,3-dihidro-benzofurano y el 1H-pirrol-2-carboxaldehído, mientras que PT1-BC y PT2-BC se encuentran alrededor de aquellos COV como el 2-isoamil-6-metilpirazina; benzaldehído, entre otros. En el último tratamiento se destaca la contribución del 2,3-dietil-5-metil-pirazina; 4-metilthiazole.

Figura 10

Diagrama de cajas y bigotes de los COV de la bebida de café preparada con grano esterilizado

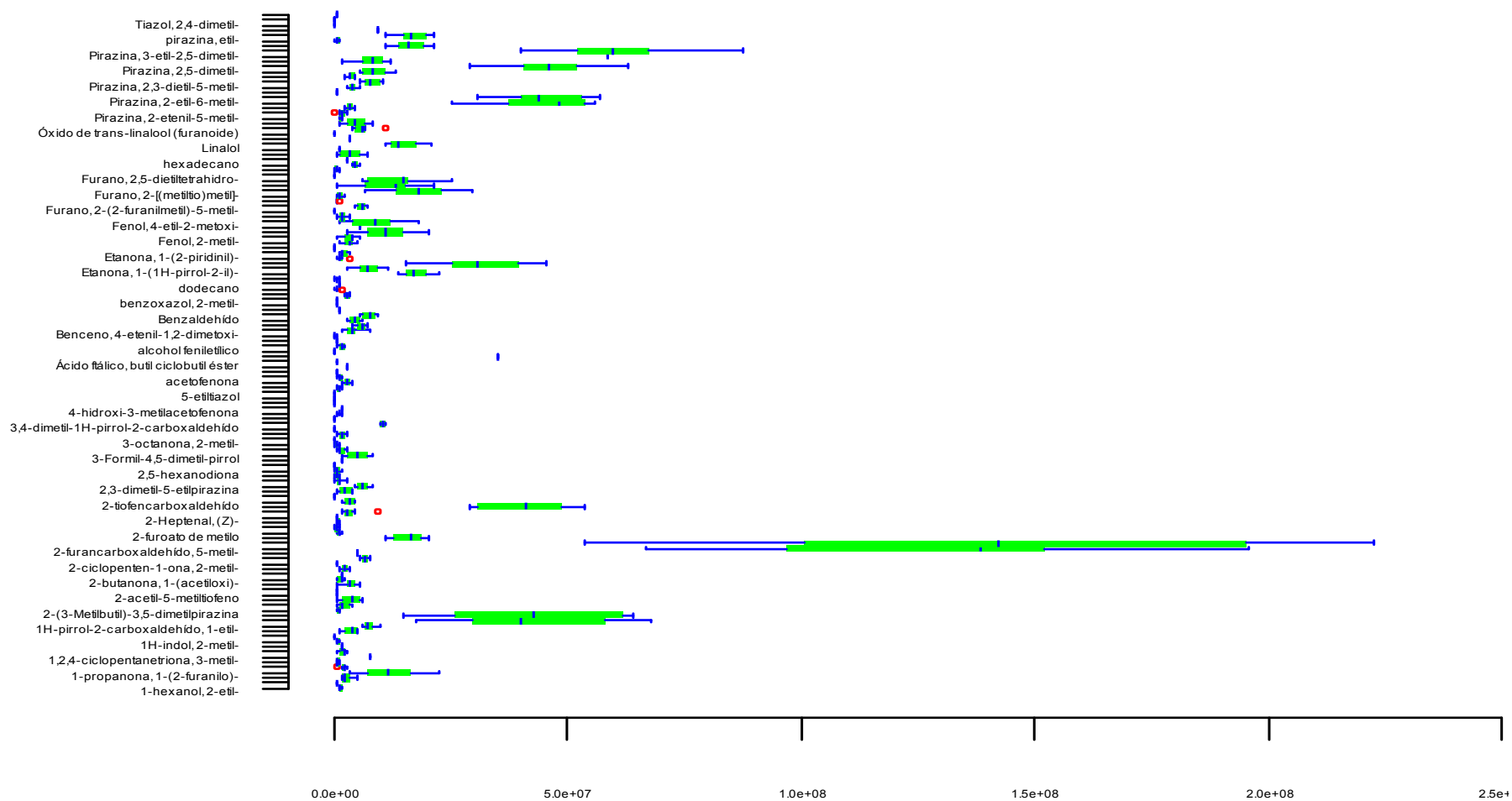


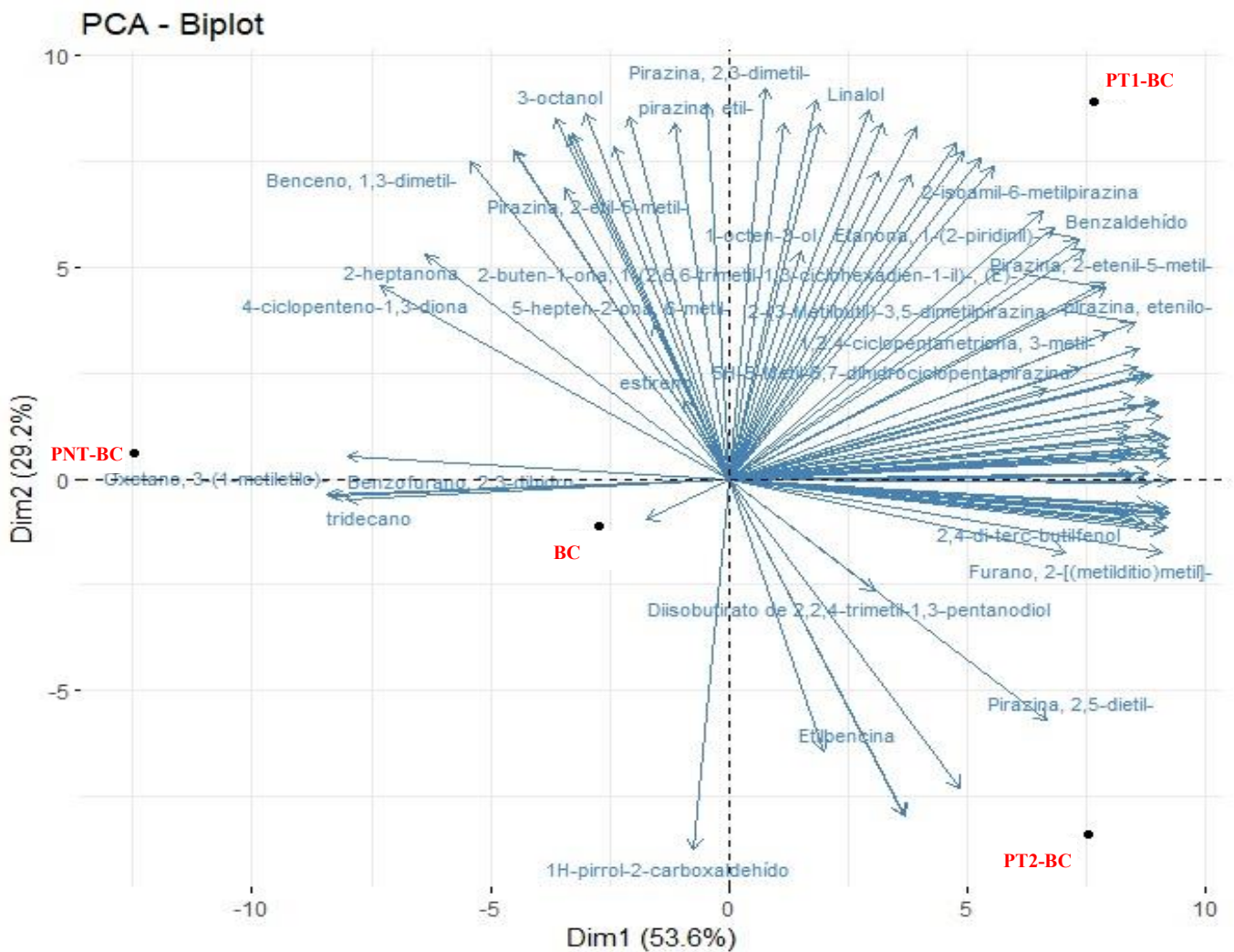
Tabla 4

Valores propios de la matriz de correlación de los COV de la bebida, CP = componente principal

	CP1	CP2	CP3	CP4
Desviación estándar	8.2899	6.1597	4.7261	3.818×10 ⁻¹⁵
Proporción de variancia	0.5327	0.2941	0.1731	0.000e+00
Proporción acumulada	0.5327	0.8268	1.0000	1.000e+00

Figura 11

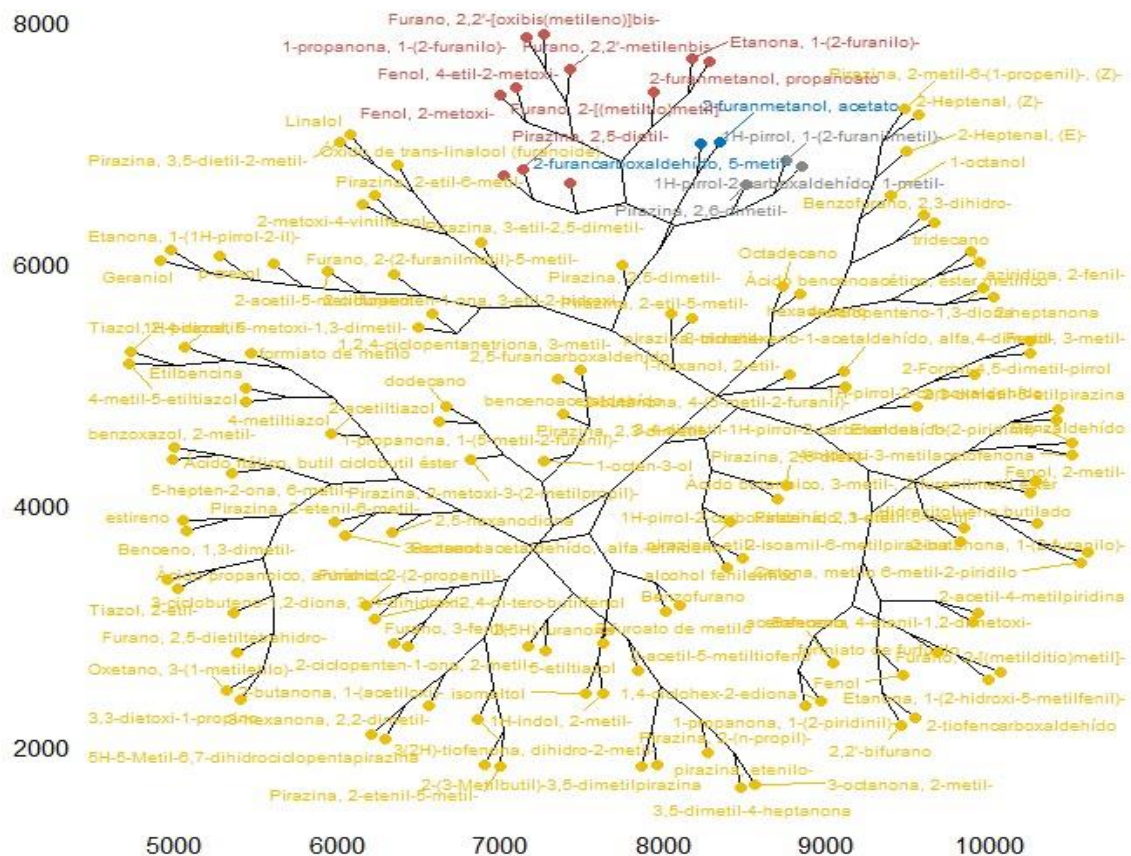
Gráfico de doble proyección de los COV de los tratamientos PNT-BC, PT1-BC, PT2-BC y BC



En el dendrograma de la Figura 12 se visualiza los agrupamientos de los COV de la bebida con una partición final de 4 conglomerados que pueden ser diferenciados por medio de los colores. La agrupación ocurre a un nivel de similitud de aproximadamente 1×10^{15} , con una correlación de 0.8702 y una distancia de varianza mínima obtenida por el método de Ward.

Figura 12

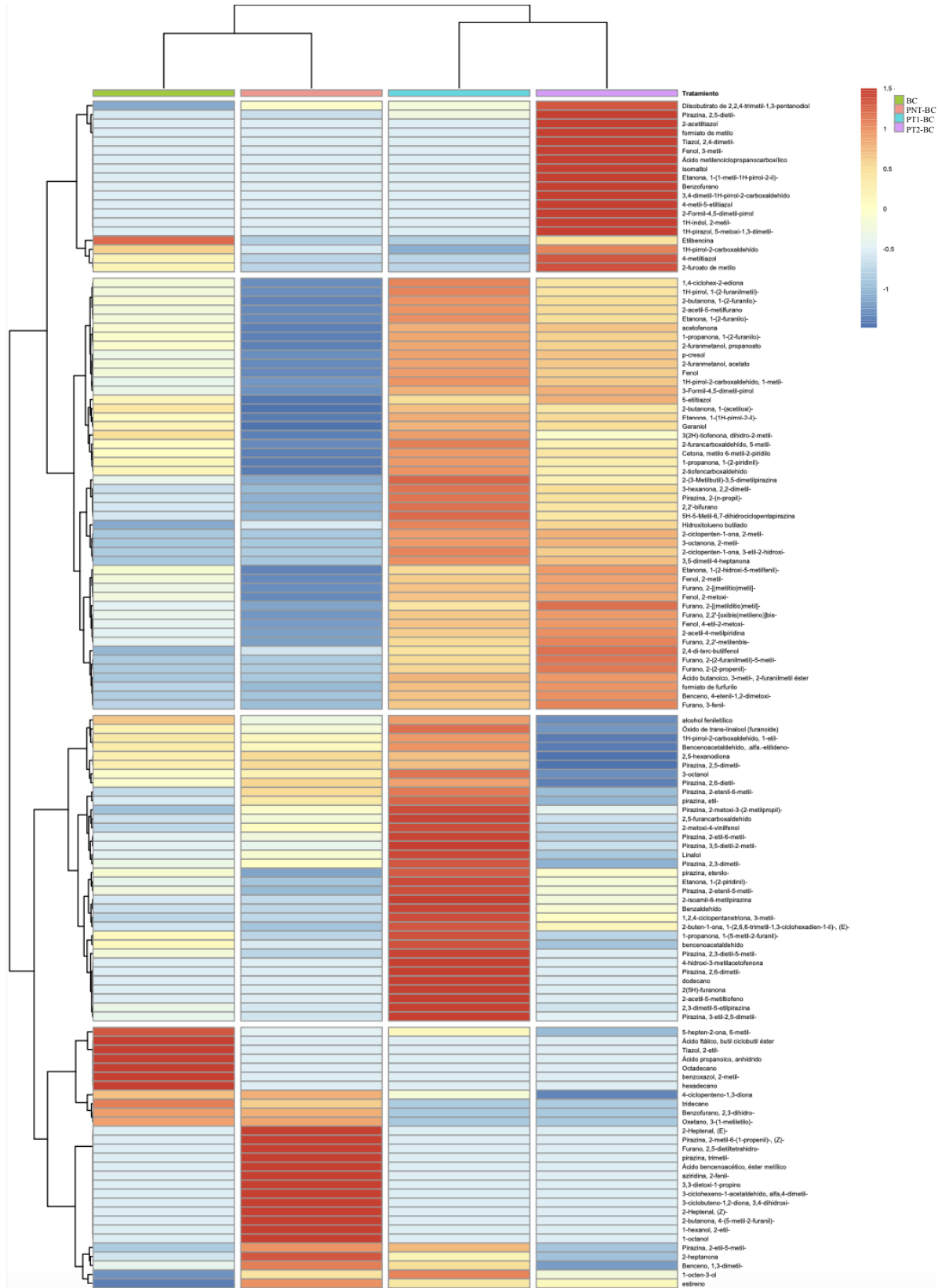
Dendrograma de los COV de la bebida del café



En el dendrograma de la Figura 13 se muestra el agrupamiento de los COV discriminado por tratamientos, como lo observado en el ACP (Figura 11). Se observa que los COV que más contribuyen en el BC son el 2-etil-tiazol, el ácido propanoico anhídrido y el 2-metil-benzoxazol. En el PNT-BC los que más contribuyen son el (E)-2-heptenal, trimetil-pirazina, 2-heptanona, entre otros. Los compuestos que más contribuyen en el PT1-BC son 2,3-dietil-5-metil- pirazina, 2,6-dimetil- pirazina, ente otros. Además, un gran número de compuestos de la clase de las pirazinas contribuyen en el PT1-BC, mientras que en el PT2-BC los COV que contribuyen son el 2-acetiltiazol, formiato de metilo, 2,4-dimetil- tiazol, entre otros.

Figura 13

Dendrograma de los COV de la bebida de café agrupados según tratamientos



El COV etilbencina es aquel que está presente en el BC y el PNT-BC con un aporte de 0.4368 y 0.2363 respectivamente, mientras que los compuestos 3-(1-metiletil)-oxetano, 2,3-dihidro-benzofurano y tridecano aportan entre 0.5 y 1.0. Asimismo, se observa en la Figura 13 cinco agrupaciones de COV reunidos en los 4 tratamientos con las siguientes cifras:

- Un primer clúster conformado por 19 COV y con una contribución alta entre 0.5 y 1.5 (amarillo claro hacia la tonalidad de color rojo) en el PT2-BC, exceptuando el etilbenceno con 0.2363;
- Un segundo clúster conformado por 48 compuestos y con una contribución que varía entre 0 y 1.0 en los tratamientos PT1-BC y PT2-BC.
- Un tercer conglomerado conformado por 34 COV y con una contribución que varía entre 0.5 y 1.5 en el PT1-BC;
- Un cuarto conglomerado conformado por 11 COV y con una contribución que varía entre 1.0 y 1.5 en el BC;
- Un quinto clúster conformado por 18 COV y con una contribución que varía entre 0 y 1.5 en el PNT-BC.

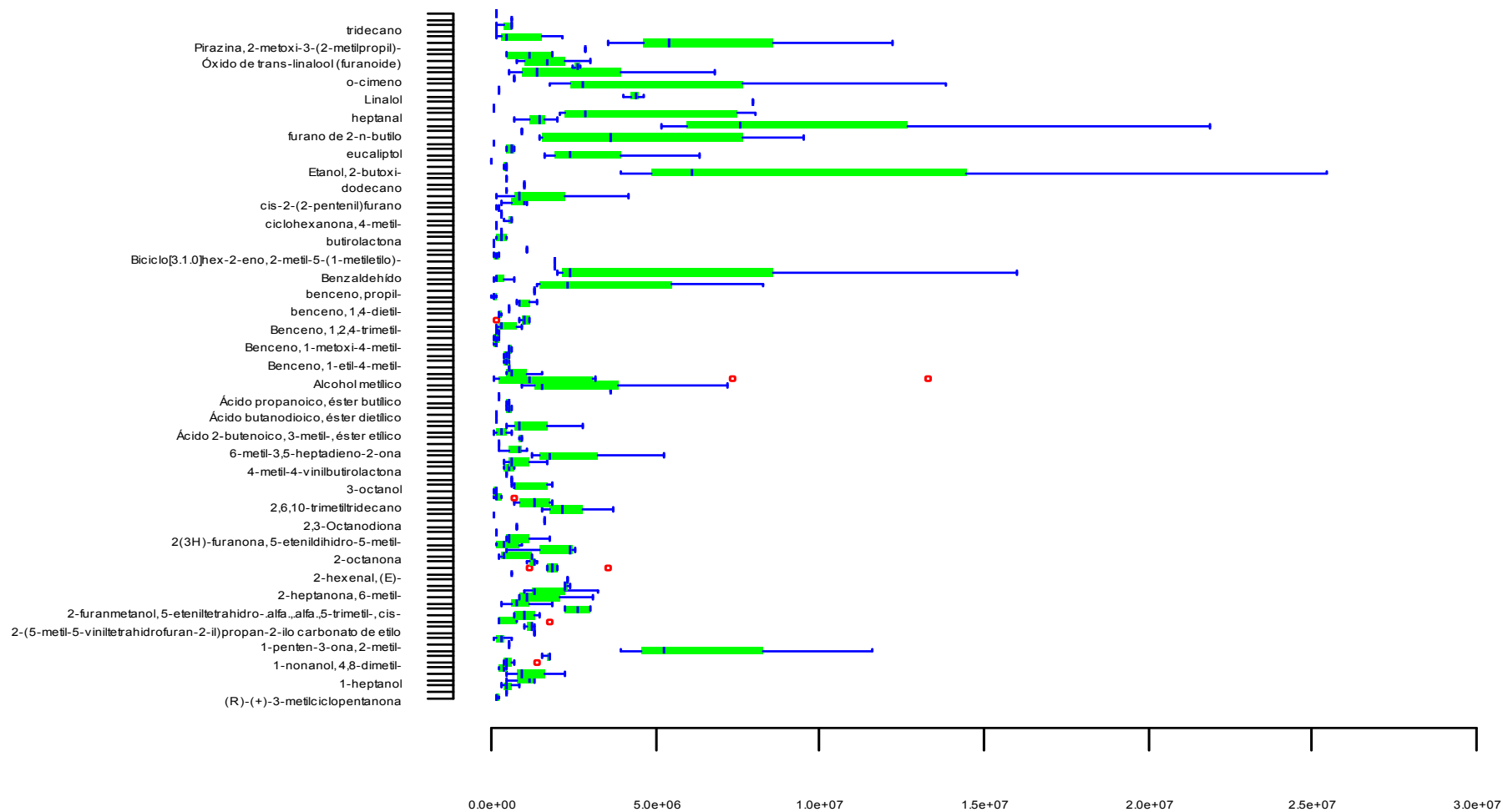
3.7. Compuestos orgánicos volátiles de los granos verdes esterilizados

La exploración de los datos se realizó a través de diagramas de cajas (Figuras 30, 31, 32 y 33 – Anexos) para conocer el comportamiento de los resultados y el comportamiento de la variable COV de los tratamientos PNT-GV, PT1-GV, PT2-GV y GV.

En la Figura 14 se puede observar el comportamiento variable abundancia en relación con cada COV, en el que los compuestos estireno; 2-pentil-furano; benzaldehído; nonanal; 2-metoxi-3-(2-metilpropil)-pirazina y 1-octen-3-ol presentan una mayor variabilidad y mayores valores en sus áreas frente a los demás. Se encontró presencia de valores atípicos en los compuestos 1,3-dimetil-benceno; 2,6,6-trimetil-2-ciclohexeno-1,4-diona, 2-acetil-5-metilfurano, 4,8-dimetil-1-nonanol, alcohol metílico y 2-metoxi-4-vinilfenol. Por la variabilidad y los valores atípicos mencionados se estandarizó los valores de abundancia utilizando la función raíz cuadrada por ser un requisito indispensable para aplicar el ACP y análisis de clúster utilizando una matriz de correlaciones con los valores previamente transformados.

Figura 14

Diagrama de cajas y bigotes de los COV del grano verde de café esterilizado



La Tabla 5 muestra la proporción de variabilidad explicada por los COV en cada componente principal, donde se observa que las dos primeras componentes explican el 87.48% de la variación total de los datos. La Figura 15 muestra los resultados de los dos primeros componentes principales descritos en la Tabla 5 (valores en negrita) sobre la contribución de aquellos COV que explican la variabilidad total de los datos.

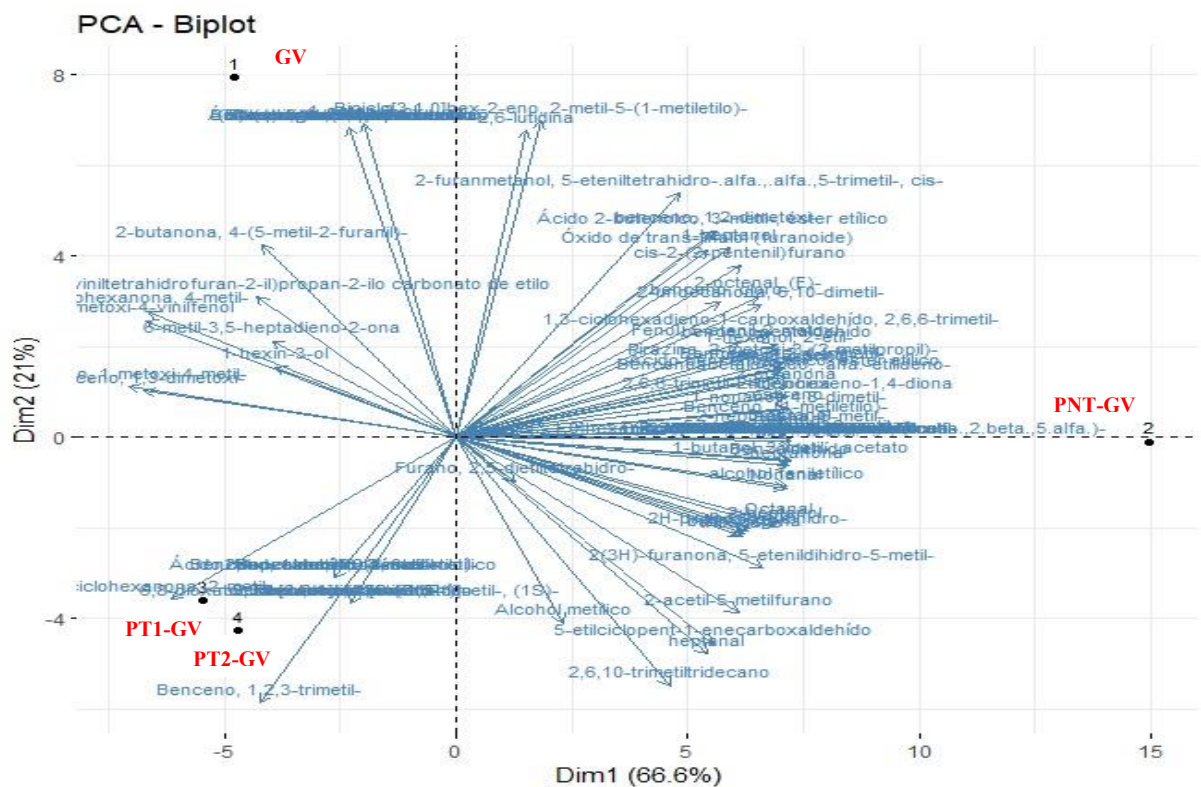
Tabla 5

Valores propios de la matriz de correlación de los COV del grano verde, CP = componente principal

	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4
Desviación estándar	8.6289	4.7585	3.7280	1.676e-15
Proporción de variancia	0.6708	0.2040	0.1252	0.000e+00
Proporción acumulada	0.6708	0.8748	1.0000	1.000e+00

Figura 15

Gráfico de doble proyección de los COV de los tratamientos PNT-GV, PT1-GV, PT2-GV y GV

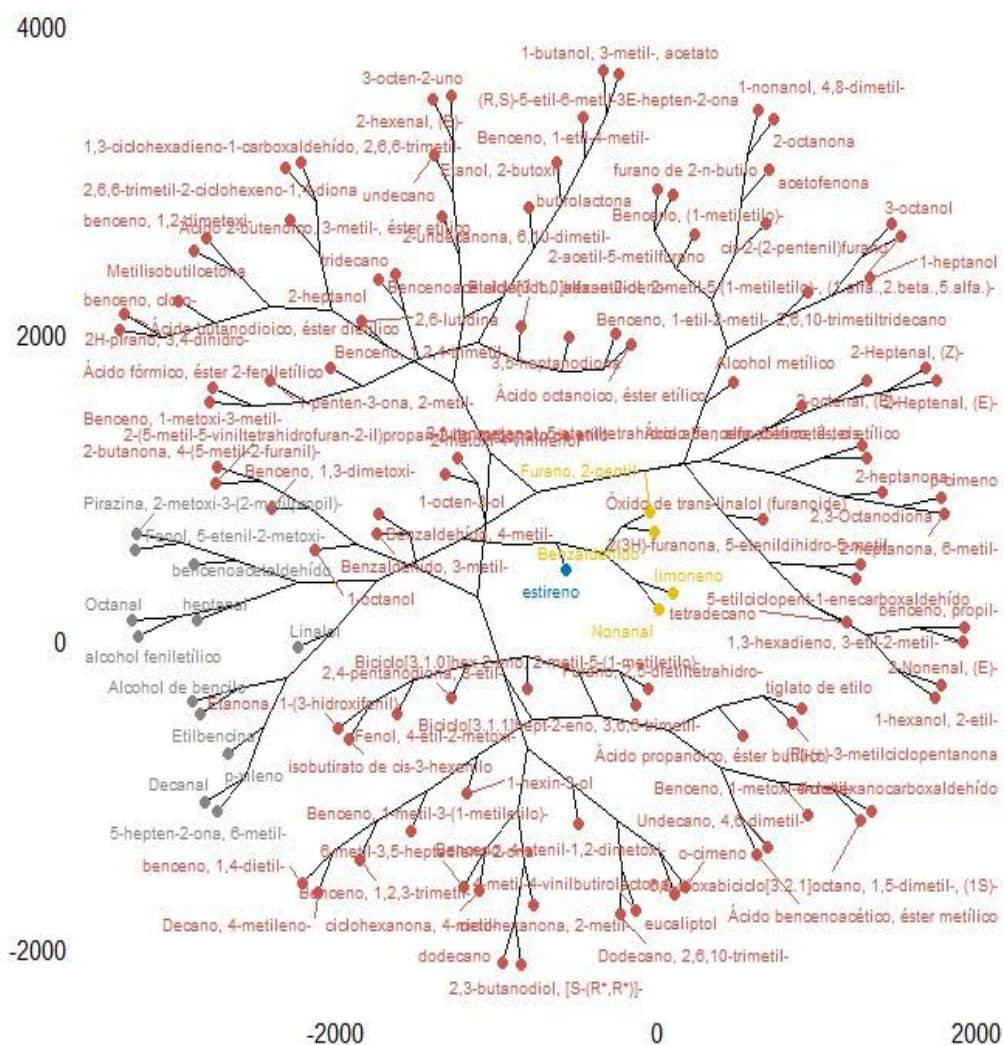


Hay evidencias significativas en las relaciones entre los COV y los tratamientos, con posibles agrupaciones de los COV sobre PNT-GV, PT1-GV, PT2-GV y GV. Así, por ejemplo, existen evidencias que el GV tiene contribución de los compuestos 1-octen-3-ol; tiglato de etilo; etc. En el PNT-GV hay contribución de compuestos como decanal, (1.alfa.,2.beta.,5.alfa.)-2-metil-5-(1-metiletilo)-biciclo[3.1.0]hexan-2-ol, mientras que para el PT1-GV existen evidencias estadísticas que los COV presentes son 3-metil-ciclohexanona, óxido de translinalool (furanoides), entre otros y, en el PT2-GV son 1,2,3-trimetil-benceno, 2-metil-ciclohexanona, (1s)-1,5-dimetil-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octano, entre otros, los que más contribuyen, información que fue agrupada según el análisis clúster.

En la Figura 16 están los COV detectados en los granos verdes de café siendo separados en 4 conglomerados.

Figura 16

Dendrograma de los compuestos volátiles del grano verde



El agrupamiento ocurre a un nivel de similitud de aproximadamente 0.7 e+14, con una correlación de 0.8786 y una distancia de varianza mínima obtenida por el método de Ward.

En la Figura 17 se muestran agrupamientos bien definidos tanto para los COV como para los tratamientos. Se observa (a) un primer clúster conformado por 73 COV y con una contribución alta entre 1.0 a 1.5 en el tratamiento PNT-GV, como en los casos del octanal = 0.9662312, nonanal = 0.9831568 y el 2,6,10-trimetiltridecano = 0.6515788; (b) en un segundo clúster están 20 COV y con una contribución que varía entre 0 y 1.5 en el tratamiento GV. Entre los COV se tiene: 1-octen-3-ol = 0.9983776 y el 2,6-lutidina = 0.1878819; (c) el tercer conglomerado es conformado por 7 COV y con una contribución que varía entre 1.0 y 1.5 en el tratamiento PT1-GV, teniendo el alcohol metílico = 0.6798051 y el 3-metil- benzaldehído = 1.000000 y; (d) el cuarto conglomerado conformado por 12 COV y con una contribución que varía entre 0.5 y 1.5 en el tratamiento PT2-GV, algunos ejemplos son el 1,2,3-trimetil- benceno = 0.5487629 y el (1S)-1,5-dimetilo-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octano = 1.000000.

3.8. Compuestos orgánicos volátiles de los hongos en medio inerte

La exploración de los datos del análisis de COV emitidos por los hongos cultivados en medio CYA fue realizada a través de diagramas de cajas (Figuras 34, 35, 36 y 37 – Anexos).

En la Figura 18 se puede observar el comportamiento variable de la abundancia (área) en relación a cada COV, donde los compuestos éster etílico del ácido 3-metil butírico, éster etílico del ácido 2-metil y 2,2,4,6,6-pentametil-heptano son los que presentan mayor variación de sus áreas. La presencia de valores atípicos en compuestos como 3-metil-2-butanona y 1-octen-3-ol fue observada. Debido a la variabilidad y presencia de valores atípicos, así como en los tratamientos que tuvieron como sustrato a la bebida de café y a los granos verdes, en los tratamientos PNT-CYA, PT1-CYA y PT2-CYA se estandarizó los valores de abundancia (áreas) utilizando una función raíz cuadrada por ser un requisito para aplicar el ACP y análisis clúster utilizando una matriz de correlaciones con los valores previamente transformados.

Figura 17

Dendrograma de los COV del grano verde agrupados según tratamientos

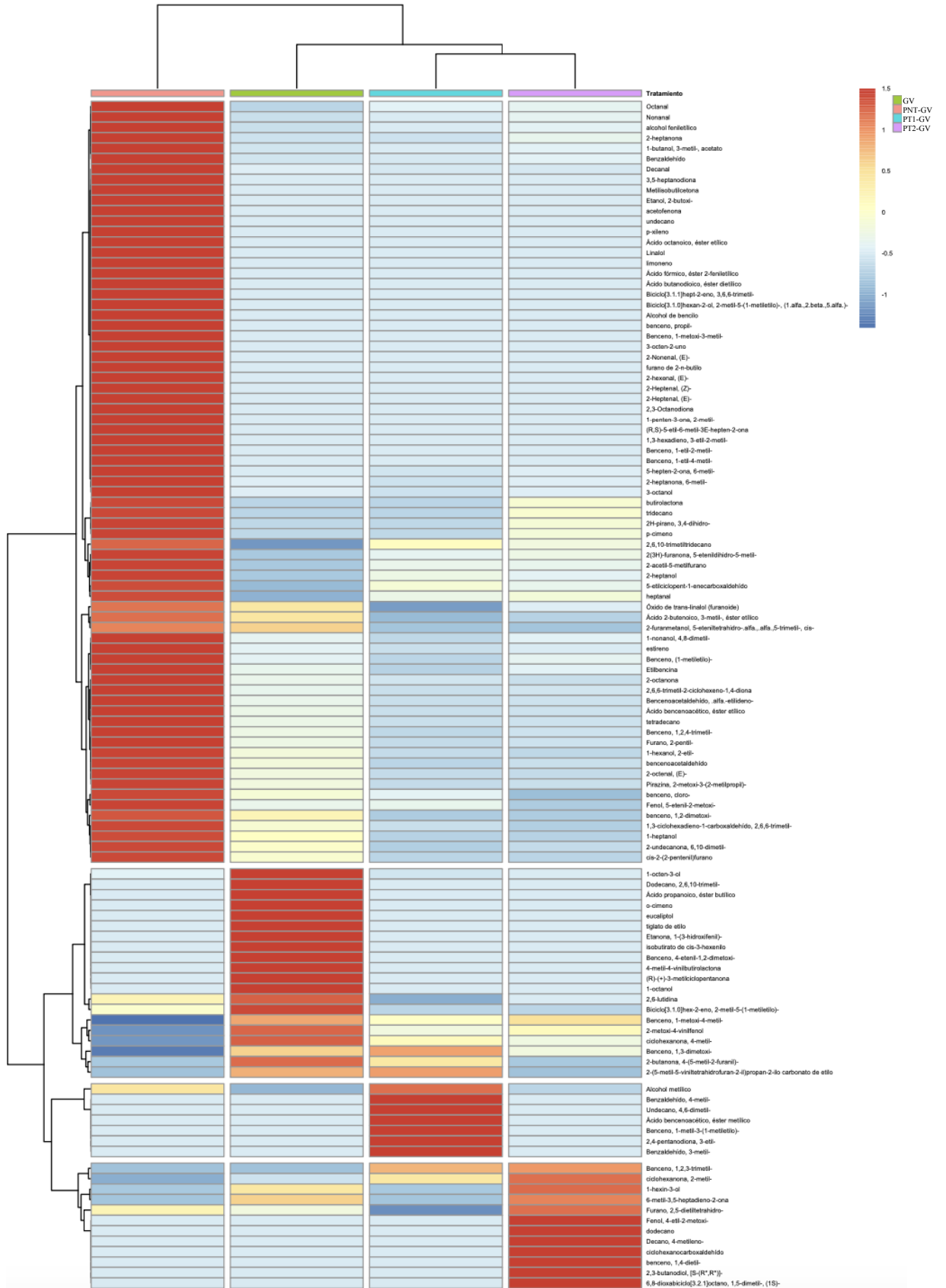
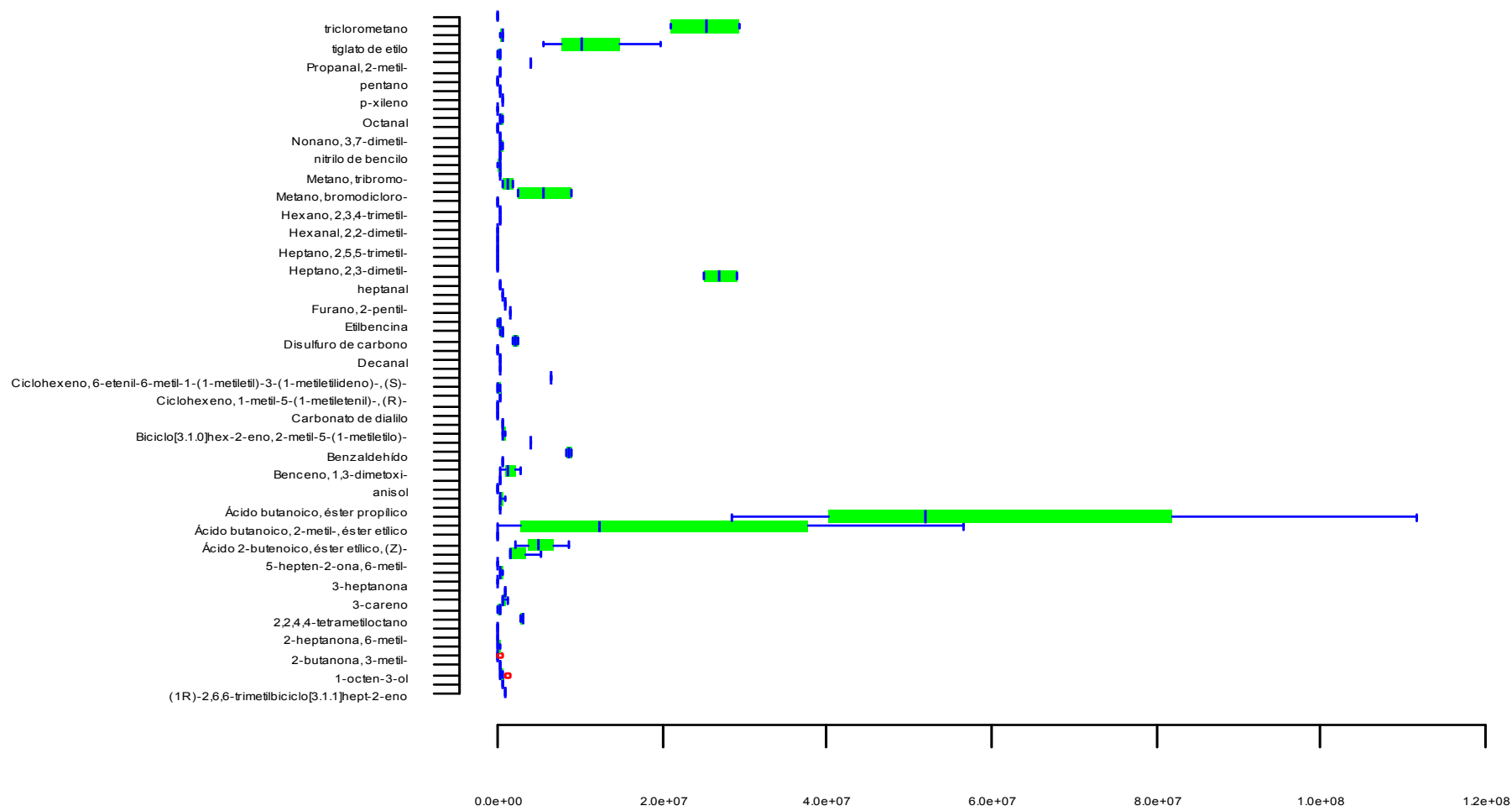


Figura 18

Diagrama de cajas y bigotes de los COV de los hongos



La Tabla 6 muestra la proporción de variabilidad explicada por los COV en cada componente principal, donde también se observa que las dos primeras componentes principales (valores en negrita) explican el 95.66% de la variación total de los datos.

Tabla 6

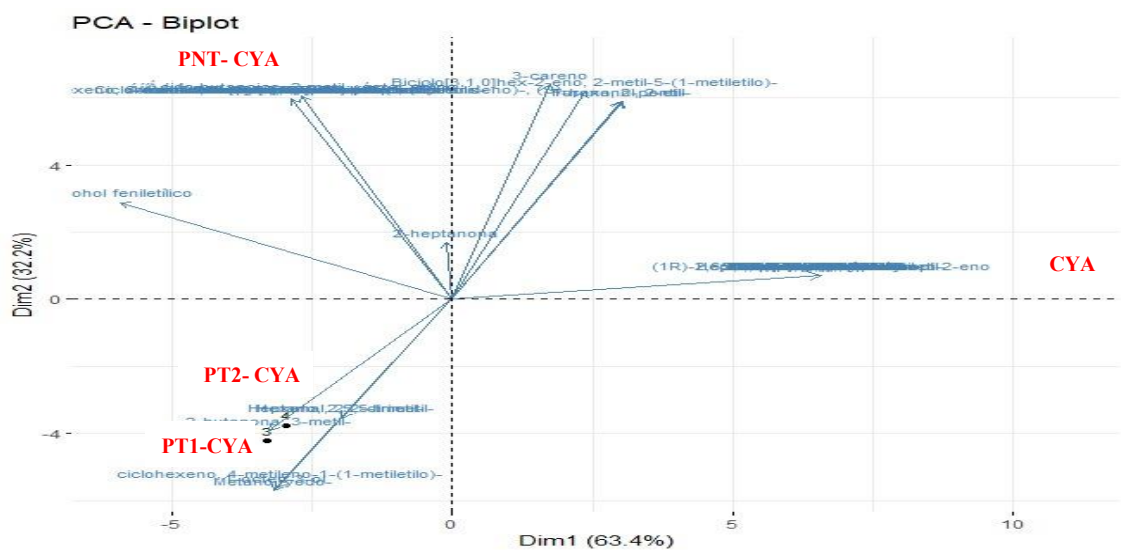
Valores propios de la matriz de correlación de los COV de los microorganismos cultivados en CYA, CP = componente principal

	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4
Desviación estándar	6.4209	4.5775	1.67870	4.202e-15
Proporción de variancia	0.6343	0.3224	0.04335	0.000e+00
Proporción acumulada	0.6343	0.9566	1.0000	1.000e+00

La Figura 19, muestra los resultados de los dos primeros componentes principales descritos en la Tabla 6 sobre la importancia de aquellos COV que explican la variabilidad total de los datos. Los dos primeros componentes explican el 95.6% de la variación total de los datos mostrando evidencias significativas en las relaciones entre los COV y los tratamientos, con posibles agrupaciones de los compuestos sobre CYA, PNT-CYA, PT1-CYA y PT2-CYA.

Figura 19

Gráfico de doble proyección de los COV de los tratamientos PNT-CYA, PT1-CYA, PT2-CYA y CYA

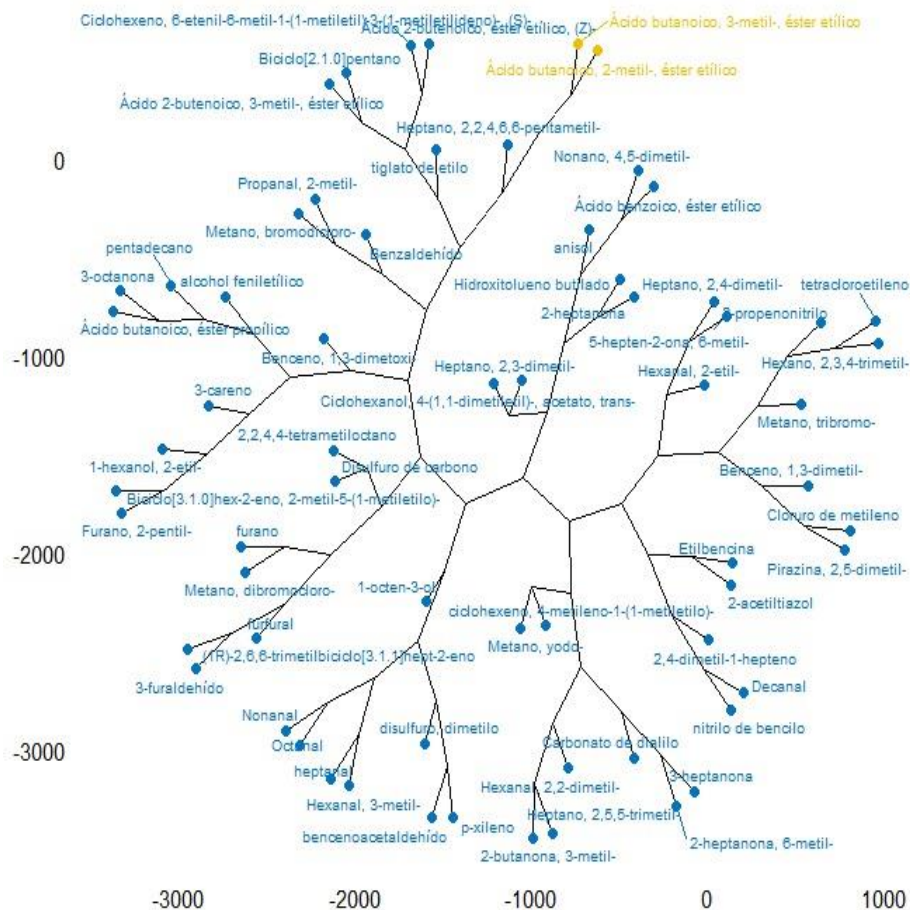


Así, por ejemplo, existen evidencias que CYA tiene contribución del compuesto (1R)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1]hept-2-eno. El tratamiento PNT-CYA tiene contribución del compuesto 2-metil-5-(1-metiletil)-bicyclo [3.1.0]hex-2-eno, mientras que en los PT1-CYA y PT2-CYA el 3-metil-2-butanone, 2,2-dimetil-hexanal, entre otros, contribuyen más, información que fue agrupada según el análisis clúster.

En la Figura 20 se muestra un dendrograma de los COV emitidos por los hongos en medio de cultivo CYA con una partición final de dos conglomerados. Esta separación ocurre a un nivel de similitud de aproximadamente $6e+14$, con una correlación de 0.9066 y una distancia de varianza mínima obtenida por el método de Ward.

Figura 20

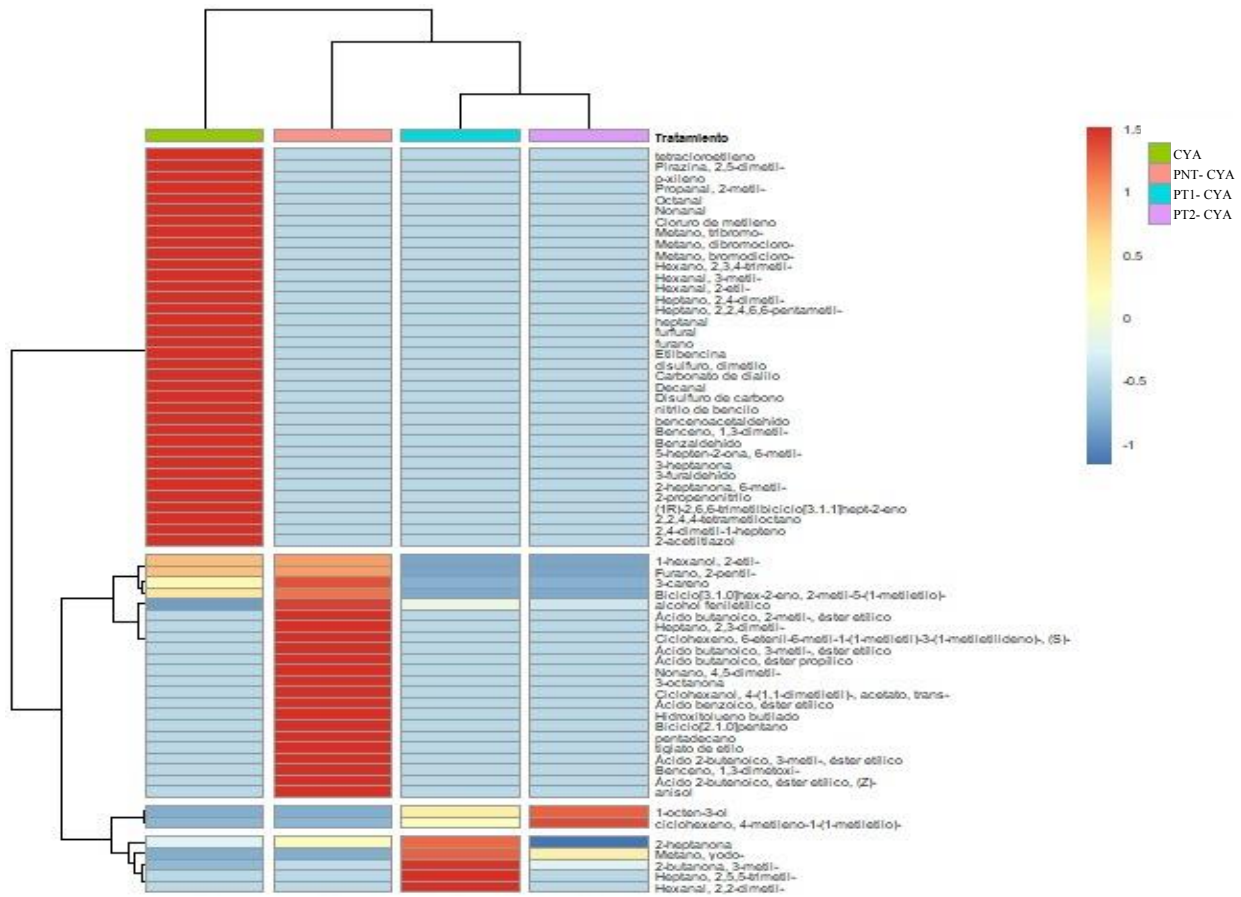
Dendrograma de compuestos volátiles de los hongos



En la Figura 21, se muestra un dendrograma en que se presenta la contribución de los COV como lo observado en el ACP, pero con un mapa de calor y especificando los tratamientos que tuvieron al medio CYA como sustrato.

Figura 21

Dendrograma de los COV de los hongos en medio de cultivo CYA agrupados según tratamientos



Los COV que más contribuyeron en el tratamiento CYA fueron el tetracloroetileno, 2,5-dimetil-pirazina, p-xileno, entre otros. En el PNT-CYA, los que más contribuyeron fueron el 2-etil-1-hexanol y el 3-carene; en el PT1-CYA el 3-metil-2-butanona y 2,2 dimetil-hexanal, mientras que en el PT2-CYA, los COV que contribuyeron fueron el 1-octen-3-ol y el 4-metileno-1-(1-metiletilo)-cyclohexene. Los COV 2-etil-1-hexanol y 2-pentil-furano estuvieron presentes en CYA y PNT-CYA y tuvieron una contribución que variaba entre 0.5 y 1.0. También se observa en la Figura 21 cuatro clústeres de COV agrupados en los 4 tratamientos con las siguientes cifras: (a) el primer clúster está conformado por 36 COV y con una contribución alta entre 1.0 a 1.5 en el CYA; (b) el segundo clúster conformado por 22 COV y con una contribución que variaba entre 0.75 y 1.5 en el PNT-CYA; (c) un tercer conglomerado conformado por 5 COV y una contribución que variaba entre 0.75 y 1.5 en el PT1-CYA; y (d) el cuarto conglomerado conformado por 2 COV y con una contribución que variaba entre 0.5 y 1.0 en el PT2-CYA.

IV. DISCUSIÓN

Los granos de café en las etapas postcosecha pueden contaminarse con hongos filamentosos, algunos capaces de producir micotoxinas que pueden dañar la calidad del producto (Geremew et al., 2016; Maman et al., 2021). Los hongos toxigénicos son un problema de importancia mundial. Dañan la calidad de los productos agrícolas y tienen un impacto negativo en la seguridad alimentaria (Balendres et al., 2019). La principal micotoxina que afecta al grano de café es la ocratoxina A (OTA) (Barcelo & Barcelo, 2017) producida por algunas especies toxigénicas de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (sección *Nigri* y *Circumdati*) (Pitt & Hocking, 2022). Además, la citrinina, otra micotoxina nefrotóxica, también puede estar presente si se detecta la infección por algunas especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Monascus* (Mohamed et al., 2013).

Vega et al. (2006) aislaron cuatro especies de *Penicillium* endofíticas que fueron consideradas como potenciales productoras de OTA, siendo ellas *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* y *P. oxalicum*. Por su parte, Alwindia y de Guzman (2016) aislaron *P. implicatum*, *P. montanense*, *P. purpurogenum*, *P. variabile*, *P. verruculosum*, *P. citrinum*, *P. corylophylum*, *P. decumbens*, *P. pelutatum*, *P. oxalicum*, *P. waksmanii* y *P. digitatum* de granos de café, de los cuales solo *P. verruculosum* producía OTA en medios artificiales. No obstante, Larsen et al. (2001) y Paterson et al. (2014) indican que *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum* son los productores principales de OTA a temperaturas templadas. Sin embargo, debido a que varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* producen OTA en determinadas condiciones ambientales (climáticas, de almacenamiento y de transporte) y condiciones de procesamiento, sea el húmedo o el seco (Pérez De Obanos et al., 2005), se originan algunas dificultades en la identificación de los hongos responsables de la contaminación por OTA (Vieira et al., 2015). Utilizando la técnica de fluorescencia en medio CAM, se puede detectar el potencial de producción de OTA o aflatoxinas y los resultados permiten verificar el potencial toxigénico del *Penicillium* toxigénico 1 y del *Penicillium* toxigénico 2 estudiados en la presente investigación.

La identificación correcta de los microorganismos es de gran importancia para poder controlar la contaminación, su crecimiento o el riesgo por la producción de micotoxinas (Rodrigues et al., 2012). No obstante, la identificación de *Penicillium* por el color de la colonia y estructuras es complicada. El color de los conidios varía de tonos de gris a azul y de azul a azul verdoso, por lo que los colores no son tan útiles en la identificación de

especies de *Penicillium* como es el caso de *Aspergillus*. Otro factor es que algunas especies de *Penicillium* forman ascosporas en la cleistotecia y también se ubican en los géneros teleomórficos de *Talaromyces* o *Eupenicillium* (Bullerman, 2003). En general, la caracterización de los aislados permitió confirmar el comportamiento esperado para el género *Penicillium* como el crecimiento considerable en el medio DG18 por ser un microorganismo xerofílico. Los aislados toxigénicos fueron capaces de crecer a 37 °C, característica inesperada que amerita ser tomada en cuenta, confirmada y, en caso necesario, estudiada. El aspecto de las colonias cultivadas a 25 °C varió dependiendo de los medios de cultivo utilizados y, si en algunos casos no fueron tan evidentes las diferencias (ver el *Penicillium* toxigénico 1 y el 2 en el medio MEA), eso dependió también de la cepa (comparar en el medio MEA el *Penicillium* toxigénico 1 y el no toxigénico). Las micrografías de las estructuras de reproducción se presentan como sustento de la identidad del hongo, sin pretensión de una identificación biológica a nivel de especie, debido a que esto requiere mayor análisis y experiencia (Pitt & Hocking, 2022).

El café es uno de los productos agrícolas más valiosos del mundo y altamente comercializado (Lashermes et al., 2008). La calidad de los granos de café se relaciona con sus propiedades físicas, químicas y sensoriales (Febrianto & Zhu, 2023), y específicamente del aroma obtenido después del tostado y las características fisicoquímicas del grano verde (Caporaso et al., 2022) que incluye el pH y contenido de humedad del mismo. En estudios anteriores acerca de la determinación del pH de granos verdes de café, se encontró pH de 5.91 para café verde no defectuoso (Mazzafera, 1999) y valores entre 5.70 y 5.84 que fueron determinados por espectroscopía de infrarrojo cercano y regresión multivariante (Araújo et al., 2020). Los resultados del pH encontrados de los granos sin esterilizar (5.83) y esterilizados (5.76) del presente trabajo están dentro del rango reportado en la literatura (Araújo et al., 2020; Mazzafera, 1999) para el grano de café verde. El contenido de humedad de los granos verdes evaluados fue de 12.4% y 14.92%, estando el segundo valor levemente por encima del recomendado (12.5%) en la identidad y calidad técnica de los granos verdes de café (Bicho et al., 2014). No obstante, tanto para los valores de pH como para la humedad, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, a pesar de que los diagramas de cajas en las Figuras 24 y 25, en anexos, muestren datos que no se sobreponen. Los resultados muestran que el autoclavado de los granos, que se espera que haya elevado el porcentaje de humedad,

fue corregido con el secado en incubadora a 37 °C para dejarlo en condiciones semejantes al grano corriente, con el detalle de que ya estaban estériles y adecuados para un experimento donde los microorganismos de interés fueron apenas los que irían a ser inoculados.

Con respecto al método de esterilización empleado en esta investigación, Alvindia y de Guzman (2016) realizaron la esterilización de la superficie de los granos de café con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y determinaron que no presenta un efecto considerable sobre la microbiota de los granos, específicamente para los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, lo que sugiere que estos están presentes principalmente dentro de los granos. En el presente trabajo se realizó la desinfección con hipoclorito de sodio al 0.4% con la misma intención de los autores mencionados, o sea, la obtención de aquellos microorganismos que infectaron el grano, siendo igualmente eficiente la menor concentración utilizada para eliminar los hongos presentes en la superficie. Los ensayos realizados, a pesar de las contaminaciones en el procedimiento (Figura 8), permiten confirmar que el método de esterilización e inoculación funcionó adecuadamente. Con respecto a la inoculación, el porcentaje superior a 80% de incidencia se consideró satisfactorio. La concentración de esporas utilizadas para la inoculación de granos en los ensayos fue bastante semejante en todos los tratamientos (Tabla 3), importante para la estandarización.

La idea de realizar la exposición de los granos a los microorganismos y, por lo tanto, también a sus toxinas, y no recurrir al uso de toxina sintética, presenta sus desventajas, ya que depende del proceso biológico del microorganismo que es afectado por su ambiente, pero tiene también un sustento. Tsubouchi et al. (1987) inocularon granos de café verde con diferentes aislados de *Aspergillus ochraceus* y reportaron que la toxina producida por inoculación del hongo puede ser más resistente al calor como resultado de la unión de la OTA a los componentes de los granos y puede representar, con mayor precisión, la contaminación natural de los granos de café. Además, demostraron que, si los granos de café verde están contaminados con OTA, casi toda la toxina estará presente en la bebida de café preparada con ellos. Estos resultados fueron comparados con Levi et al. (1974) en que inocularon directamente la OTA en los granos de café y, se verificó que durante el proceso de tostado, la mayor parte de la OTA fue degradada. Durante el proceso de tostado, el grano de café incrementa considerablemente su volumen y pierde alrededor del 18% de su peso por acción del aire caliente (Drunday & Pacin, 2013). Generalmente,

las esporas de hongos y el micelio son sensibles a la temperatura de tostado del café, mientras que algunas micotoxinas ya sintetizadas como la OTA no son afectadas (Attiya et al., 2021). La reducción del nivel de OTA durante el tostado depende de la severidad del proceso térmico, del producto final requerido y de la contaminación inicial por OTA (Castellanos-Onorio et al., 2011; Romani et al., 2003). Otros autores (Barcelo & Barcelo, 2017) obtuvieron una disminución de OTA entre 53 y 99% después de 12 min del tostado de granos de café en un rango de temperatura de 180 a 240 °C. Sin embargo, Boudra et al. (1995) reportaron que la completa degradación de la OTA no va a ocurrir aunque se aplique una temperatura de 250 °C.

El proceso de tostado en el presente trabajo, al haber sido realizado en una estufa y tener que abrirla para mezclar los granos periódicamente para la obtención de un tostado regular, presentó el inconveniente de ser afectado por fluctuaciones de temperatura que prolongaron el proceso al punto de ser necesario 1.5 h hasta que el grano presentase el punto de tostado deseado. El tiempo de tostado fue bastante prolongado, estando muy por encima de los 11, 12.5 y 15 min de los niveles de tueste claro, medio y oscuro, respectivamente, obtenido utilizando un tostador de café Genecafe CR-100 a 245 °C (Lee et al., 2016). Asimismo, Murthy et al. (2019) realizaron el tostado de los granos de café utilizando un tostador de tambor en 3 a 5 min a 230 °C.

Un factor importante para la liberación de los COV es el tamaño de la partícula obtenida después del molido del café tostado, así como la especie de café utilizada en la preparación de la bebida. Algunos autores mencionan que la concentración de la mayoría de los COV de la bebida de café Robusta se mostró en un tamaño de partícula entre 200 a 300 μm , excepto el furano, 2-metilfurano y 2,5-dimetilfurano. En la bebida elaborada con café Arábica, los aldehídos no fueron afectados del tamaño de la partícula. El hexanal, los fenoles y algunos furanos se detectan en mayor cantidad con un tamaño de partícula de 300 a 425 μm (De Vivo et al., 2022). En el proceso del molido se utilizó un tamiz con una apertura de 850 μm . Sin embargo, eso no fue una barrera para la extracción de los 131 COV de los 4 tratamientos de la bebida analizados.

A continuación, se realiza una valoración de algunos COV con respecto a sus características reportadas y lo encontrado en el presente trabajo. Es importante destacar, como se observa en los resultados, que los análisis fueron realizados independientemente para cada substrato, es decir, el análisis del PNT-BC, PT1-BC, PT2-BC, BC, fue realizado

de forma independiente del análisis del PNT-GV, PT1-GV, PT2-GV, GV, y este a su vez, independiente del PNT-CYA, PT1-CYA, PT2-CYA, CYA.

A priori, los resultados de interés son aquellos COV encontrados de forma absoluta, es decir, en las 3 repeticiones del análisis, en los tratamientos que involucran a los tratamientos con PT1 y PT2, que son los hongos toxigénicos, tanto en la bebida, el grano verde, como directamente de los hongos. Esto significaría que son COV específicos. En su defecto, el resultado de interés sería detectar los COV en el PT1-BC y PT2-BC, el PT1-GV y PT2-GV o directamente del PT1-CYA y PT2-CYA. En tercer lugar, un resultado de interés sería aquel en el que se detecten los COV solamente en el BC y el PNT-BC y en el GV y el PNT-GV. El interés inicial en la presente investigación fue detectar COV específicos de los hongos toxigénicos en la bebida por su importancia en la seguridad alimentaria y las pocas investigaciones realizadas para esta etapa del proceso del café. Además, existiría el potencial de proteger a los catadores rechazando lotes sospechosos antes de que sean evaluados sensorialmente. Sin embargo, por razones prácticas, la detección de COV que permitan detectar los hongos toxigénicos en el grano verde serían mejor aplicadas. Debido a que las condiciones de detección entre la bebida y el grano verde fueron distintas y ello incluye la presencia de agua en el primer caso, era esperada la posibilidad de encontrar COV distintos, ya que el agua es un solvente polar, y en el caso del grano verde no se utilizó ninguna solución. Además, en el caso de los tratamientos PNT-CYA, PT1-CYA y el PT2-CYA, no hubo interrupción de las células fúngicas o molido. Esto quiere decir que esta investigación podría ser complementada por múltiples tratamientos que hagan de eslabones entre los actuales tratamientos y permitan evaluar la influencia del molido, los solventes y confirmar si los COV son específicos del hongo o de la interacción de estos con los granos de café. Además, en próximos análisis podría ser importante incluir un tratamiento de granos no esterilizados para confirmar la especificidad de los COV para los aislados toxigénicos o el género *Penicillium*.

Después de realizar un ordenamiento manual de los 271 COV detectados en una planilla de Excel, se reconocieron 25 COV que fueron detectados sólo el BC, PNT-BC, PT1-BC y el PT2-BC y en todas las repeticiones. Otros 12 COV estuvieron presentes en la mayoría de los tratamientos BC, PNT-BC, PT1-BC, PT2-BC, con menores detecciones en algunos casos, pero que no parecen representar alguna ventaja para diferenciar los tratamientos de interés. Lo más probable es que estos compuestos se forman como producto del proceso de la obtención de la bebida, esto es, el tostado, el molido y el filtrado. En el caso de los

tratamientos que tuvieron como sustrato a los granos verdes, es decir, el GV, PNT-GV, PT1-GV y el PT2-GV, se encontraron 3 compuestos detectados de forma exclusiva y en todas las repeticiones tales como acetato 3-metil-1-butanol; (1-metiletilo)-benceno; éster etílico del ácido bencenoacético. Se puede deducir que son compuestos propios del grano verde, probablemente no presentes en los hongos y que se pierden después de la exposición al calor y todo el proceso que involucra la obtención de la bebida filtrada. De forma general, parece que el proceso de filtrado y presencia de agua en estos tratamientos permitió una detección mayor o diferente de COV con el método cromatográfico utilizado.

En solo un tratamiento, pero sólo en 1 repetición, fueron detectados 78 COV. Aunque con una optimización del método de preparación de la muestra podría conseguirse una mayor sensibilidad, para efectos de este trabajo, se descartaron como posibles marcadores.

A continuación, se mencionan algunos COV interesantes. El COV 1-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-etanona fue encontrado en las tres repeticiones del tratamiento PT2-BC. En el caso del GV fueron encontrados de forma exclusiva 4 COV: el (R,S)-5-etil-6-metil-3E-hepten-2-ono, (E)-2-nonenal, 1-metoxi-3-metil-benceno y éster etílico del ácido octanoico con potencial para ser utilizado como un marcador negativo de la infestación por *Penicillium*, suponiendo que este no sea encontrado en granos no estériles. Los COV (Z)-éster etílico del ácido 2-butanoico, 3-octanona, anisole y el éster etílico 3-metil del ácido butanoico fueron encontrados exclusivamente en el PNT-CYA. Su ausencia en los otros sustratos sea grano verde o la bebida filtrada, lo hacen bastante particular en su comportamiento, pudiendo tratarse de un COV producido específicamente en el medio de cultivo, que en este caso fue el CYA, y lo diferencia de las cepas toxigénicas. Entre los compuestos que sólo pudieron ser encontrados en los tratamientos PT1-CYA y PT2-CYA se destaca sólo al yodo-metano, pero sólo en 2 de las 3 repeticiones, en ambos tratamientos. De la misma forma, se destaca al 1,2,3-trimetil-benceno, en el caso del PT1-GV y el PT2-GV, y el 2-(2-propenil)-furano, en el caso del PT1-BC y el PT2-BC, respectivamente, pero con 3 detecciones en el caso del PT2-BC.

Los diagramas de cajas presentados en la Figura 10, 14 y 18 muestran una aparente amplia variabilidad en algunos COV encontrados en la bebida, los granos verdes o directamente de los aislados fúngicos. También se encuentran algunos datos inconsistentes que no fueron descartados del análisis, por no haber evidencias de ser producto de un error en el registro de los datos o fallas identificadas en los procedimientos. En el caso del análisis

de componentes principales (ACP), se encontró en todos los experimentos que los dos primeros componentes principales consiguieron explicar más del 80% de la variabilidad de los datos, que es un porcentaje aceptable para su selección, dispensándose las demás dimensiones o componentes. El diagrama del ACP o el gráfico de doble proyección (Figura 11) muestra que muchos compuestos aportan más a algunos tratamientos que a otros. Es importante señalar que este diagrama hace parte de la exploración de los datos. Por el gran número de COV encontrados, no es posible una visualización detallada de los resultados. Aun así, permite visualizar algunas relaciones interesantes, como la cercanía entre los tratamientos PT1-GV y PT2-GV y entre los tratamientos PT1-CYA y PT2-CYA (Figura 15 y 19). Es importante recordar que los COV encontrados en el CYA fueron desconsiderados en el PNT-CYA, PT1-CYA y el PT2-CYA, por no ser de interés en la presente investigación. Es decir, el CYA funcionó como un blanco o control. Ese es en parte el motivo de encontrar menos COV en los tratamientos que tuvieron como sustrato al CYA. Los dendrogramas de las Figuras 13, 17 y 21 acaban siendo más informativos para el propósito del estudio. Queda evidente que los tratamientos donde fueron inoculados los hongos toxigénicos 1 y 2 fueron más próximos entre ellos que los inoculados con el PNT. Los dendrogramas también permiten diferenciar clústers o agrupamientos dentro de cada tratamiento que hace posible diferenciarlos de los otros. Es decir, COV especiales que podrían servir como marcadores de identificación en base a las áreas determinadas por el GC-MS. Es importante notar que no sólo la mayor contribución (color rojo), sino también la menor (color azul) indican potenciales marcadores que podrían servir más adelante, después de más pruebas de confirmación, para la identificación de bebida preparada con grano esterilizado o sometido al calor, grano infestado por *Penicillium* toxigénicos o no toxigénicos, con implicancias prácticas o científicas no completamente predecibles. En el caso de la Figura 17 y 21, se aprecia que las agrupaciones de COV son más nítidas, con aparentemente más candidatos a marcadores químicos.

Los furanos son COV importantes en el café tostado, tanto en términos de cantidad de compuestos como de contribución de aroma a la bebida (Rabelo et al., 2021). Las pirazinas son el segundo compuesto aromático más abundante y le dan al café sus sabores tostados y a nuez, mientras que las cetonas son responsables de las notas afrutadas, florales y de miel. (Prakash et al., 2022). En el presente trabajo se reportaron 15 furanos, 22 pirazinas y 20 cetonas en la bebida de café. Compuestos como el 2,3,5,6-

tetrametilpirazina, pirazina, 2,3-butanodiol meso, 2-metil-5-(1-propenil) pirazina, ácido hexanoico, 4-etil-guayacol y sulfuro de isopropil p-cresilo son marcadores potenciales de granos de café defectuosos (Toci & Farah, 2008). Aunque los granos inoculados con los hongos podrían ser considerados defectuosos, no se encontró estos COV en los granos verdes inoculados, tampoco en la bebida preparada con los granos inoculados.

La bebida de café generalmente es caracterizada por la presencia de compuestos azufrados y pirazinas, como el 2-furfuriltiol, sulfuro de metilo de furfurilo y 2-etil-6-metilpirazina (Cheong et al., 2013). El 2-etil-6-metilpirazina fue encontrado en todos los tratamientos de la bebida a pesar de no haber sido detectado en los granos verdes, lo que podría indicar su formación durante el tostado de los granos, concordando con Ramli et al. (2006) que menciona que las pirazinas, así como los aldehídos, son formados durante el tostado por la reacción de aminoácidos y azúcares reductores durante la Reacción de Maillard. Además, este compuesto puede considerarse uno de los precursores del aroma de la bebida de café (Cheong et al., 2013). Sin embargo, más importante que la identificación de las pirazinas en los alimentos, es definir su vía de formación y el efecto sensorial en el alimento (Maga, 1992).

El 2-furanmetanol fue el compuesto principal en los cafés tostados impartiendo notas de nuez, dulce, caramelo, horneado, cereza y maní (Prakash et al., 2022; Várady et al., 2022). Sin embargo, en nuestros resultados no se reportó este compuesto que pudo haberse afectado en la elaboración de la bebida. Por otra parte, se encontró que el compuesto 4-(5-metil-2-furanyl)-2-butanona, se reportó solo en el PNT-BC y además presenta una alta contribución hacia este tratamiento (Figura 13).

Franca et al. (2009) realizaron una comparación de los COV de los granos de café defectuosos (negros, verdes y amargos) y sanos, con el fin de identificar posibles marcadores químicos para la detección de granos defectuosos en café tostado. Los compuestos ácido benceno acético (éster metílico), 2-isoamil-6-metilpirazina, 1H-pirrol, 4-metilthiazol y 1,5-dimetil-2-pirrolcarbonitrilo fueron considerados como posibles marcadores químicos de granos defectuosos (Agresti et al., 2008; Toledo et al., 2016). Uno de los compuestos que presentaron mayor contribución en el tratamiento PT1-BC fue el 2-isoamil-6-metilpirazina reportado como posible marcador químico en la literatura. Los COV 4-metilthiazol (Toledo et al., 2016) y 2,3-dietil-5-metil-pirazina que confieren notas terrosas negativas (Sanz et al., 2002), son algunos de los compuestos que presentan mayor contribución en el PT2-BC.

En la investigación de Yang et al. (2016) acerca de los COV de la bebida de café, mencionaron algunos compuestos como el 2,3-dimetilpirazina, que confiere notas de nuez, tostada y verde, el 2,6-dimetilpirazina (aroma a nuez, dulce, frita), 2-etil-6-metilpirazina (aroma a tostado, parecido a una avellana) y 2,5-dimetilpirazina (nuez, tostada, hierba, maíz), que también fueron encontrados en nuestros resultados, resaltando una contribución alta de los 3 primeros COV mencionados a la PT1-BC. El compuesto 1-(1H-pirrol-2-il)-etanona, que confiere características de nuez y mohoso (Agresti et al., 2008; Yang et al., 2016), el 1-(2-furanilmetil)-1H-pirrol (Agresti et al., 2008; Zambonin et al., 2005) y el 2-etil-5-metilpirazina (Zambonin et al., 2005) fueron reportados tanto en granos defectuosos como en granos sanos de café tostado. Estos compuestos fueron encontrados en nuestros resultados de la bebida, siendo que los 2 primeros compuestos presentan una contribución moderada positiva hacia el PT1-BC y una contribución alta negativa al PNT-BC.

El alcohol bencílico y el alcohol feniletílico atribuyen una nota floral a los granos de café verde (Zhang et al., 2022), siendo estos compuestos encontrados en todos los tratamientos asociados al grano verde, teniendo una mayor contribución en el GV, pudiendo ser indicadores de la ausencia de microorganismos.

Toci y Farah (2014) encontraron compuestos como el 3-octanol, 1-octen-3-ol, 2-heptanona, 2-pentil-furano y el benzaldehído en granos verdes, coincidiendo con nuestros resultados. Por otra parte, los compuestos 4-etil-1,2-dimetoxi-benceno y (R)-(+)-3-metilciclopentanona, solo se detectaron como COV del PNT-GV, presentando una contribución alta en este tratamiento (Figura 17). Dichos compuestos pueden considerarse como posibles marcadores químicos de la presencia del *Penicillium* no toxigénico en el grano verde.

El compuesto pentadecan-2-ona (aroma floral) no fue encontrado en ningún tratamiento de la bebida, y el 3-octanona (olor herbal) fue encontrado solo en el PNT-CYA. Estas cetonas asociadas a características positivas de la bebida, han sido reportadas en el café inoculado con *P. brevicompactum* (Iamanaka et al., 2014). Esta falta de detección de la 3-octanona no era esperada, en vista de que ha sido reportada como el compuesto producido con mayor frecuencia por 16 especies de *Penicillium*, entre ellos *P. commune*, *P. hirsutum* var. *venetum* y *P. viridicatum*. Se considera que este compuesto está biosintéticamente relacionado con la producción del 1-octen-3-ol y del 3-octanol porque siempre han sido detectados juntos (Larsen y Frisvad, 1995). Es interesante notar que en

el caso del PNT-CYA no se detectaron esos dos alcoholes, a pesar de estar presente la 3-octanona. Además, en los tratamientos PT1-CYA y PT2-CYA fue detectado el compuesto 1-octen-3-ol, pero no el otro alcohol ni la cetona. Finalmente, el 3-octanol no fue encontrado en ningún tratamiento.

El 1-octen-3-ol fue encontrado en todos los tratamientos, con excepción del PNT-CYA y el CYA, y tuvo mayor abundancia en el PT2-CYA. Este COV es conocido como alcohol de hongos y presenta un olor típico a hongos (Zhang et al., 2021). Es posible que sea responsable por el olor indeseable a tierra y moho producido por *Penicillium crustosum* en medio de cultivo CYA (Iamanaka et al., 2014). Este COV también es producido con frecuencia por *P. verucosum* (Pasanen et al., 1996), *P. chrysogenum*, *P. camemberti* y *P. viridicalum* (Larsen y Frisvad, 1995).

Los compuestos, 3-metil-2-butenato de etilo y (Z)-2-butenato de etilo fueron detectados solamente como COV emitidos por PNT-CYA. Sin embargo, de las 47 especies de *Penicillium* evaluadas por Larsen y Frisvad (1995), ninguna de ellas producen estos compuestos.

Investigaciones con reportes sobre la influencia de la infección de granos de café en los COV de la bebida filtrada final no son muy numerosas. Es posible que esto se deba a la complejidad de factores que afectan la presencia y abundancia de COV. El potencial uso de los datos generados es previsible en el sentido de su uso en narices electrónicas y otros métodos que permitan evaluar la calidad del café, en inspecciones, auditorías, entre otros. Sin embargo, existe amplio espacio para otras investigaciones aplicadas y tecnologías que podrán ser más previsibles, conforme se continúe avanzando y complementando esta línea de investigación.

V. CONCLUSIONES

Se encontró un total de 131 compuestos volátiles en la bebida de café y 116 COV en el grano verde.

El compuesto 4-(5-metil-2-furanil)-2-butanona y los compuestos 4-etenil-1,2-dimetoxibenceno y (R)-(+)-3-metilciclopentanona podrían ser considerados como posibles marcadores químicos de la presencia de *Penicillium* no toxigénico en la bebida y en los granos verdes de café, respectivamente.

Para los aislados toxigénicos no se logró encontrar un marcador químico absoluto que nos pueda dar una pista de la presencia de estas cepas en la bebida y en el grano verde de café. Sin embargo, se detectó posibles candidatos a marcadores químicos de la presencia de estas cepas toxigénicas en la bebida, entre ellos a los compuestos 2-(2-propenil)-furano y 2-metil-3-octanona, y en el grano verde al 1,2,3-trimetil-benceno; entre otros. Estos COV aun requieren de un proceso de validación, para su confirmación como marcadores químicos.

VI. RECOMENDACIONES

- ▶ Realizar un análisis sensorial de la bebida preparada con los granos esterilizados y sin esterilizar.
- ▶ Analizar y cuantificar la o las toxinas en los granos inoculados.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agresti, P. D. C. M., Franca, A. S., Oliveira, L. S., & Augusti, R. (2008). Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile. *Food Chemistry*, *106*(2), 787–796. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.019>
- Aguilar-Alvarez, M. E., Castañeda, G. S., Durand, N., Gaime, I. P., Robles, R. O. G., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2021). The variety, roasting, processing, and type of cultivation determine the low OTA levels of commercialized coffee in Chiapas State, Mexico. *Food Control*, *126*(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108088>
- Alfenas, A. C., & Mafia, R. G. (2007). *Métodos em fitopatologia* (J. R. da S. Lana & M. M. Brandão (eds.); Editora UF).
- Alvinda, D. G., & de Guzman, M. F. (2016). Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. *Mycotoxin Research*, *32*(2), 61–67. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0240-3>
- Araújo, C. da S., Macedo, L. L., Vimercati, W. C., Ferreira, A., Prezotti, L. C., & Saraiva, S. H. (2020). Determination of pH and acidity in green coffee using near-infrared spectroscopy and multivariate regression. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(6), 2488–2493. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10270>
- Attiya, W. Al, Hassan, Z. U., Al-Thani, R., & Jaoua, S. (2021). Prevalence of toxigenic fungi and mycotoxins in Arabic coffee (*Coffea arabica*): Protective role of traditional coffee roasting, brewing and bacterial volatiles. *PLoS ONE*, *16*(10 October). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259302>
- Balendres, M. A. O., Karlovsky, P., & Cumagun, C. J. R. (2019). Mycotoxigenic fungi and mycotoxins in agricultural crop commodities in the Philippines: A Review. *Foods*, *8*(7), 249. <https://doi.org/10.3390/foods8070249>
- Barcelo, J. M., & Barcelo, R. C. (2017). Food Additives & Contaminants : Part A Post-harvest practices linked with ochratoxin A contamination of coffee in three provinces of Cordillera Administrative Region , Philippines provinces of Cordillera Administrative Region , Philippines. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *00*(00), 1–13. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1393109>

- Bertrand, B., Boulanger, R., Dussert, S., Ribeyre, F., Berthiot, L., Descroix, F., & Joët, T. (2012). Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food Chemistry*, *135*(4), 2575–2583. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.060>
- Bicho, N., Leitao, A., & Lidon, J. (2014). Application of colour parameters for assessing the quality of Arabica and Robusta green coffee. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *26*(1), 09. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i1.17190>
- Borém, F. M., Abreu, G. F. de, Alves, A. P. de C., Santos, C. M. dos, & Teixeira, D. E. (2021). Volatile compounds indicating latent damage to sensory attributes in coffee stored in permeable and hermetic packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, *29*(February). <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100705>
- Boudra, H., Le Bars, P., & Le Bars, J. (1995). Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(3), 1156–1158. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.1156-1158.1995>
- Budryn, G., Nebesny, E., Kula, J., Majda, T., & Krysiak, W. (2011). HS-SPME / GC / MS Profiles of Convectively and Microwave Roasted Ivory Coast Robusta Coffee Brews. *Czech J. Food Sci.*, *29*(2), 151–160.
- Bullerman, L. B. (2003). Fungi in Food– An Overview. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second, pp. 5511–5522). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01129-9>
- Caporaso, N., Whitworth, M. B., Cui, C., & Fisk, I. D. (2018). Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. *Food Research International*, *108*(April), 628–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.077>
- Caporaso, N., Whitworth, M. B., & Fisk, I. D. (2022). Prediction of coffee aroma from single roasted coffee beans by hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, *371*(September 2021), 131159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131159>
- Castellanos-Onorio, O., Gonzalez-Rios, O., Guyot, B., Fontana, T. A., Guiraud, J. P., Schorr-Galindo, S., Durand, N., & Suárez-Quiroz, M. (2011). Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control*, *22*(8), 1184–1188.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.014>

- Cheong, M. W., Tong, K. H., Ong, J. J. M., Liu, S. Q., Curran, P., & Yu, B. (2013). Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. *Food Research International*, 51(1), 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.058>
- Davila-Garcia, J. D. (2023). *Perfil de compuestos orgánicos volátiles de la bebida de café preparada con granos inoculados con un hongo toxigénico y uno no toxigénico determinado por GC-MS*. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza.
- De Vivo, A., Genovese, A., Tricarico, M. C., Aprea, A., Sacchi, R., & Sarghini, F. (2022). Volatile compounds in espresso resulting from a refined selection of particle size of coffee powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, 114, 104779. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104779>
- Drunday, V., & Pacin, A. (2013). Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans , ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. *Food Control*, 30(2), 675–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.004>
- Faria, C. B., dos Santos, F. C., de Castro, F. F., Sutil, A. R., Sergio, L. M., Silva, M. V., Machinski, M., & Barbosa-Tessmann, I. P. (2017). Occurrence of toxigenic *Aspergillus flavus* in commercial bulgur wheat. *Food Science and Technology (Brazil)*, 37(1), 103–111. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.09316>
- Febrianto, N. A., & Zhu, F. (2023). Coffee bean processing: Emerging methods and their effects on chemical, biological and sensory properties. *Food Chemistry*, 412(December 2022), 135489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135489>
- Franca, A. S., Oliveira, L. S., Oliveira, R. C. S., Agresti, P. C. M., & Augusti, R. (2009). A preliminary evaluation of the effect of processing temperature on coffee roasting degree assessment. *Journal of Food Engineering*, 92(3), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.012>
- Gaslac-Culqui, F. (2022). *Incidencia de hongos con potencial toxigénico presentes en café de la provincia de Rodríguez de Mendoza – Amazonas* [Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas]. <https://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/2953>

- Gebrekidan, M., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B. S., Ele, E., Mohammed, A. M., & Mamo, H. (2019). Influence of altitudes of coffee plants on the alkaloids contents of green coffee beans. *Chemistry International*, 5(4), 247–257.
<https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.2604404>
- Geremew, T., Abate, D., Landschoot, S., Haesaert, G., & Audenaert, K. (2016). Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. *Food Control*, 69, 65–73.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.025>
- Iamanaka, B. T., Teixeira, A. A., Teixeira, A. R. R., Vicente, E., Frisvad, J. C., Taniwaki, M. H., & Bragagnolo, N. (2014). Potential of volatile compounds produced by fungi to influence sensory quality of coffee beverage. *Food Research International*, 64, 166–170. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.06.017>
- Kumar, P., Devi, P., & Dey, S. R. (2021). Fungal volatile compounds: a source of novel in plant protection agents. In A. Kumar, J. Singh, & J. B. T.-V. and M. of M. Samuel (Eds.), *Volatiles and Metabolites of Microbes* (pp. 83–104). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824523-1.00001-8>
- Larsen, T. O., & Frisvad, J. C. (1995). Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycological Research*, 99(10), 1153–1166.
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80271-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80271-2)
- Larsen, T. O., Svendsen, A., & Smedsgaard, J. (2001). Biochemical characterization of Ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3630–3635.
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3630-3635.2001>
- Lashermes, P., Andrade, A. C., & Etienne, H. (2008). Genomics of Coffee One of the World's Largest Traded Commodities. In *Genomics of Tropical Crop Plants*.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-71219-2_9
- Lee, L. W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2016). Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: I. Green coffee. *Food Chemistry*, 30.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.076>
- Levi, C. P., Trenk, H. L., & Mohr, H. K. (1974). Study of the occurrence of ochratoxin

- A in green coffee beans. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 57(4), 866–870. <https://doi.org/10.1093/jaoac/57.4.866>
- Maga, J. A. (1992). Pyrazine update. *Food Reviews International*, 8(4), 479–558. <https://doi.org/10.1080/87559129209540951>
- Maman, M., Sangchote, S., Piasai, O., Leesutthiphonchai, W., Sukorini, H., & Khewkhom, N. (2021). Storage fungi and ochratoxin A associated with arabica coffee bean in postharvest processes in Northern Thailand. *Food Control*, 130(May), 108351. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108351>
- Mazzafera, P. (1999). Chemical composition of defective coffee beans. In *Food Chemistry* (Vol. 64, Issue 4, pp. 547–554). [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00167-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00167-8)
- Meena, M., Zehra, A., Dubey, M. K., Aamir, M., & Upadhyay, R. S. (2020). *Penicillium* Enzymes for the Food Industries. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 167–186). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00009-0>
- Mohamed, S., Flint, S., Palmer, J., Fletcher, G. C., & Pitt, J. I. (2013). An extension of the coconut cream agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. *Letters in Applied Microbiology*, 57(3), 214–219. <https://doi.org/10.1111/lam.12102>
- Murthy, P. S., P, S. H., K, B., & Kusumoto, K. I. (2019). Modulation of coffee flavor precursors by *Aspergillus oryzae* serine carboxypeptidases. *Lwt*, 113(January), 108312. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108312>
- Pasanen, A.-L., Lappalainen, S., & Pasanen, P. (1996). Volatile organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins. *The Analyst*, 121(12), 1949–1953. <https://doi.org/10.1039/an9962101949>
- Paterson, R. R. M., Lima, N., & Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, 61, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.037>
- Pérez-Escalante, J. J., Gómez-Chávez, I. A., & Estela-Escalante, W. D. (2021). Isolation of microorganisms from the feces of ring-tailed coati related to the production of

- “misha coffee” in the central forest of Peru and evaluation of some features of technological importance. *Microbiological Research*, 245, 126670.
<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2020.126670>
- Pérez De Obanos, A., González-Peñas, E., & López De Cerain, A. (2005). Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. *Food Additives and Contaminants*, 22(5), 463–471.
<https://doi.org/10.1080/02652030500090042>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer US.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2022). *Fungi and food spoilage* (Fourth Edi). Springer International Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-85640-3>
- Prakash, I., R, S. S., P, S. H., Kumar, P., Om, H., Basavaraj, K., & Murthy, P. S. (2022). Metabolomics and volatile fingerprint of yeast fermented robusta coffee: A value added coffee. *LWT*, 154. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112717>
- R Development Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. In *R Foundation for Statistical Computing* (Vol. 2).
- Rabelo, M. H. S., Borém, F. M., de Lima, R. R., Alves, A. P. de C., Pinheiro, A. C. M., Ribeiro, D. E., dos Santos, C. M., & Pereira, R. G. F. A. (2021). Impacts of quaker beans over sensory characteristics and volatile composition of specialty natural coffees. *Food Chemistry*, 342, 10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128304>
- Ramli, N., Hassan, O., Said, M., Samsudin, W., & Idris, N. A. (2006). Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(3), 280–298.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2006.00065.x>
- Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2012). Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International*, 48(1), 76–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.02.007>
- Romani, S., Pinnavaia, G. G., & Rosa, M. D. (2003). Influence of roasting levels on Ochratoxin A content in coffee. *Agricultural and Food Chemistry*, 5168–5171.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf030116p>

- Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Andersen, B. (2010). Food and Indoor Fungi. In *CBS Laboratory Manual Series 2*.
- Sanchez, K., & Chambers, E. I. (2015). How does product preparation affect sensory properties? An example with coffee. *Journal of Sensory Studies*, *2013*, 499–511. <https://doi.org/10.1111/joss.12184>
- Sanz, C., Czerny, M., Cid, C., & Schieberle, P. (2002). Comparison of potent odorants in a filtered coffee brew and in an instant coffee beverage by aroma extract dilution analysis (AEDA). *European Food Research and Technology*, *214*(4), 299–302. <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0459-9>
- Sualeh, A., Tolessa, K., & Mohammed, A. (2020). Biochemical composition of green and roasted coffee beans and their association with coffee quality from different districts of southwest Ethiopia. *Heliyon*, *6*(12), e05812. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05812>
- Thammarat, P., Kulsing, C., Wongravee, K., Leepipatpiboon, N., & Nhujak, T. (2018). Identification of volatile compounds and selection of discriminant markers for elephant dung coffee using static headspace gas chromatography—mass spectrometry and chemometrics. *Molecules*, *23*(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23081910>
- Toci, A. T., & Farah, A. (2008). Volatile compounds as potential defective coffee beans' markers. *Food Chemistry*, *108*(3), 1133–1141. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.064>
- Toci, A. T., & Farah, A. (2014). Volatile fingerprint of Brazilian defective coffee seeds: Corroboration of potential marker compounds and identification of new low quality indicators. *Food Chemistry*, *153*, 298–314. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.040>
- Toledo, P. R. A. B., Pezza, L., Pezza, H. R., & Toci, A. T. (2016). Relationship between the different aspects related to coffee quality and their volatile compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(4), 705–719. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12205>

- Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Hisada, K., Sakabe, Y., & Udagawa, S. ichi. (1987). Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. *Mycopathologia*, *97*(2), 111–115.
<https://doi.org/10.1007/BF00436848>
- Várady, M., Tauchen, J., Fraňková, A., Klouček, P., & Popelka, P. (2022). Effect of method of processing specialty coffee beans (natural, washed, honey, fermentation, maceration) on bioactive and volatile compounds. *LWT*, *172*, 8.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114245>
- Vargas, R., Fonseca, C., Hareau, G., Ordinola, M., Pradel, W., Robiglio, V., & Suarez, V. (2021). Health crisis and quarantine measures in Peru: Effects on livelihoods of coffee and potato farmers. *Agricultural Systems*, *187*, 103033.
<https://doi.org/10.1016/j.agsy.2020.103033>
- Vega, F. E., Posada, F., Peterson, S. W., Gianfagna, T. J., & Chaves, F. (2006). *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia*, *98*(1), 31–42. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.1.31>
- Viegas, C., Pacífico, C., Faria, T., de Oliveira, A. C., Caetano, L. A., Carolino, E., Gomes, A. Q., & Viegas, S. (2017). Fungal contamination in green coffee beans samples: A public health concern. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, *80*(13–15), 719–728.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1286927>
- Vieira, T., Cunha, S., & Casal, S. (2015). Mycotoxins in Coffee. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (Issue Chapter 10, pp. 225–233). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00025-5>
- Yang, N., Liu, C., Liu, X., Degn, T. K., Munchow, M., & Fisk, I. (2016). Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects. *Food Chemistry*, *211*, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.124>
- Zambonin, C. G., Balest, L., De Benedetto, G. E., & Palmisano, F. (2005). Solid-phase microextraction–gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis for the characterization of roasted coffees. *Talanta*, *66*(1), 261–265.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.11.023>
- Zhang, K., Cheng, J., Hong, Q., Dong, W., Chen, X., Wu, G., & Zhang, Z. (2022).

Identification of changes in the volatile compounds of robusta coffee beans during drying based on HS-SPME/GC-MS and E-nose analyses with the aid of chemometrics. *LWT*, 161, 113317. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113317>

Zhang, L., Dong, X., Feng, X., Ibrahim, S. A., Huang, W., & Liu, Y. (2021). Effects of drying process on the volatile and non-volatile flavor compounds of *Lentinula edodes*. *Foods*, 10(11), 2836. <https://doi.org/10.3390/foods10112836>

ANEXOS

Figura 22

Proceso de obtención de un cultivo puro a partir de punta de hifa, (a) técnica de estriado, (b) observación de esporas individualizadas y (c) recorte bajo el estereoscopio

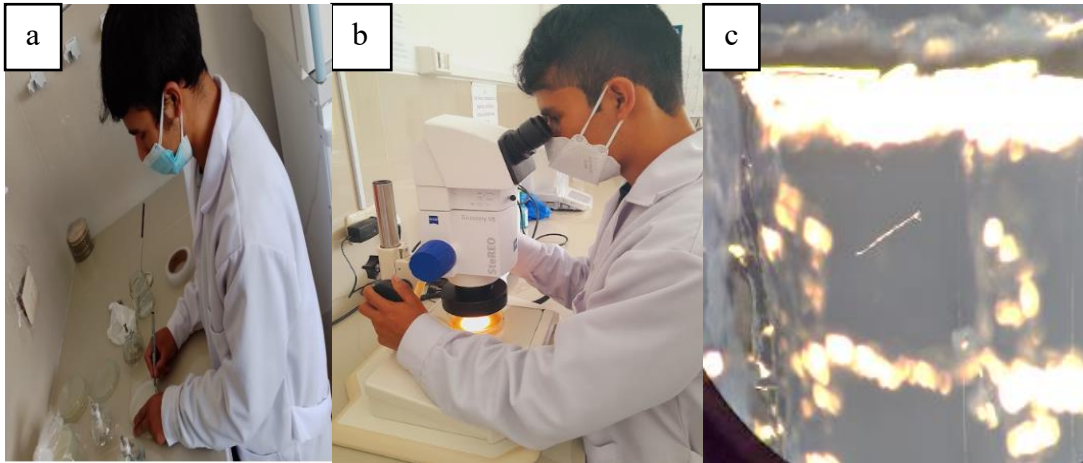


Figura 23

Cepas de *Penicillium* en medio CYA, incubadas a 37°C por 7 días. PNT (primera fila de a, c, b y d), PT1 (segunda fila de a y c) y PT2 (segunda fila de b y d)

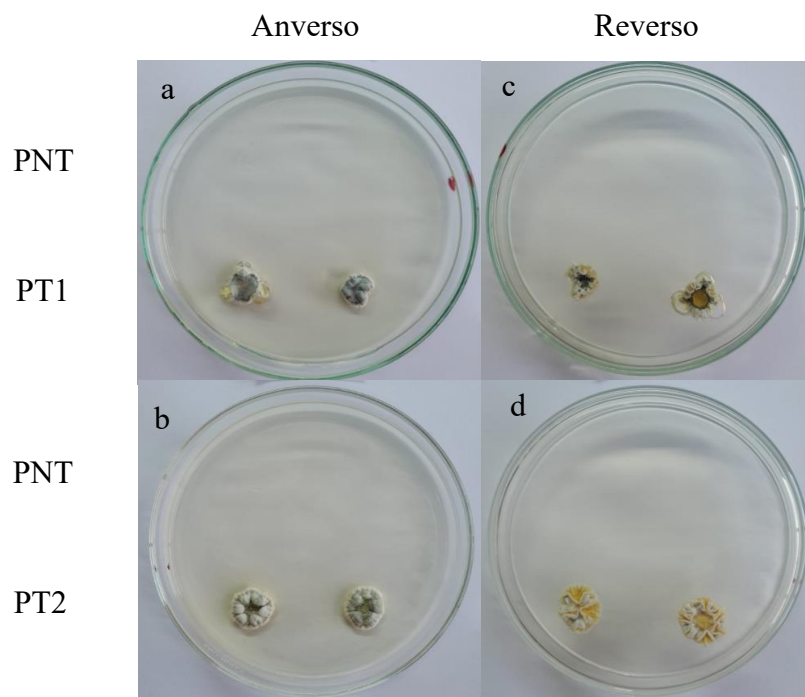


Tabla 7

Diámetro de los hongos en medios CYA, MEA, G25N, YES y DG18, medidos del 5to al 7mo día de incubación a 25°C

HONGOS	CREC.	DIAM.	CYA				MEA				G25N				YES				DG18			
			R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3	PROM.
PNT	DIA 5	D1	22.2	21.53	21.35	21.62	24.21	24.6	25.17	24.57	20.02	20.7	-	19.68	17.48	19.77	21.24	19.6	20.3	21.12	21.06	20.93
		D2	22.2	21.53	20.9		23.78	24.55	25.12		18.8	19.2	-		17.45	20.43	21.23		20.5	21.12	21.5	
	DIA 6	D1	25.25	24.68	24.5	24.62	27.52	28.42	28.91	27.83	22.79	23.8	-	22.63	18.09	21.44	22.43	20.61	25.45	25.89	26.1	25.86
		D2	25.25	23.96	24.07		26.22	27.54	28.37		21.31	22.6	-		18.39	20.9	22.43		25.73	25.89	26.09	
	DIA 7	D1	27.9	28.09	27.44	27.51	30.3	31.97	32.54	31.16	25.48	26.61	-	25.66	19.05	23.16	23.67	21.81	30.45	30.23	31.04	30.61
		D2	27.71	26.98	26.96		30.24	30.6	31.31		25.66	24.9	-		19.54	21.78	23.68		30.55	30.23	31.13	
PT1	DIA 5	D1	21.65	22.66	22.42	21.96	19.03	19.12	17.56	18.45	15.64	17.13	-	16.01	16.16	17.06	15.03	16.02	22.1	23.15	24.17	23.07
		D2	21.35	21.58	22.1		18.52	18.74	17.72		15.34	15.91	-		16.25	17.04	14.57		22.1	22.84	24.06	
	DIA 6	D1	25.16	25.57	24.92	24.62	20.08	20.26	18.79	19.6	19.7	19.87	-	20.06	16.9	17.9	15.16	16.6	26.58	26.88	27.56	26.83
		D2	24.07	24.3	23.71		18.79	20.26	19.42		20.8	19.87	-		16.77	17.77	15.12		25.68	26.76	27.51	
	DIA 7	D1	26.31	27.26	26.43	26.54	21.13	20.43	19.78	20.27	23.75	22.93	-	23.43	17.52	18.61	15.34	17.09	30.03	29.85	30.17	29.98
		D2	26.27	26.24	26.73		19.18	21.09	20		24.95	22.07	-		17.25	18.53	15.3		29.12	30.15	30.56	
PT2	DIA 5	D1	21.35	22.22	21.4	21.91	17.52	19.22	19.34	19.23	13.4	14	-	13.97	21.9	22.72	19.68	21.69	20.02	22.62	18.88	20.66
		D2	19.79	21.9	24.8		20.52	19.44	19.34		13.4	15.06	-		21.9	23.13	20.81		20.21	22.55	19.67	
	DIA 6	D1	24.49	24.84	25	25	18.91	20.67	20.5	20.4	16.68	16.58	-	16.82	22.87	24.06	22.23	23.29	22.76	23.88	21.42	22.66
		D2	23.3	24.84	27.54		22.11	20.43	19.75		16.52	17.5	-		23.56	24.8	22.22		22.75	24	21.15	
	DIA 7	D1	25.89	26.13	26.05	26.16	22.69	21.09	21.19	20.94	18.81	18.67	-	18.8	24.06	26.08	25.65	25.47	25.03	25.5	24.87	25.11
		D2	23.87	26.42	28.61		19.25	21.19	20.2		17.55	20.17	-		24.76	26.24	26.04		25.13	25.87	24.23	

Figura 24

Diagrama de cajas y bigotes del pH de los granos de café esterilizados y sin esterilizar

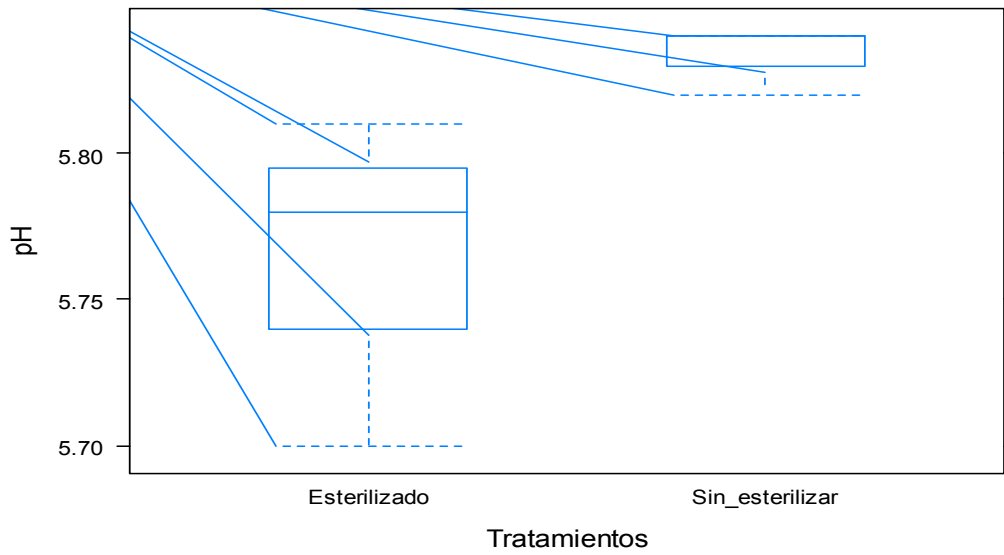


Figura 25

Diagrama de cajas y bigotes del contenido de humedad de los granos de café esterilizados y sin esterilizar

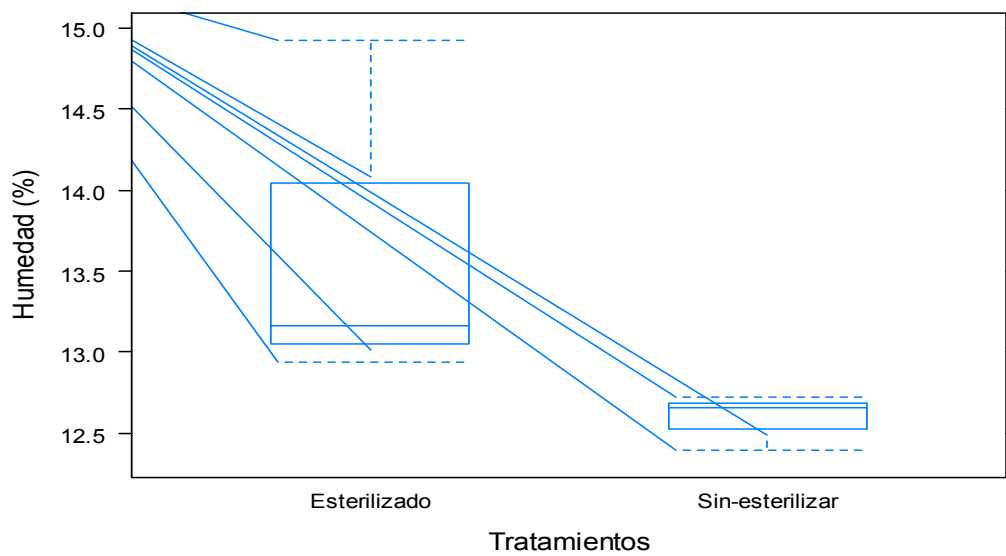


Figura 26

Diagrama de cajas y bigotes de los COV del BC

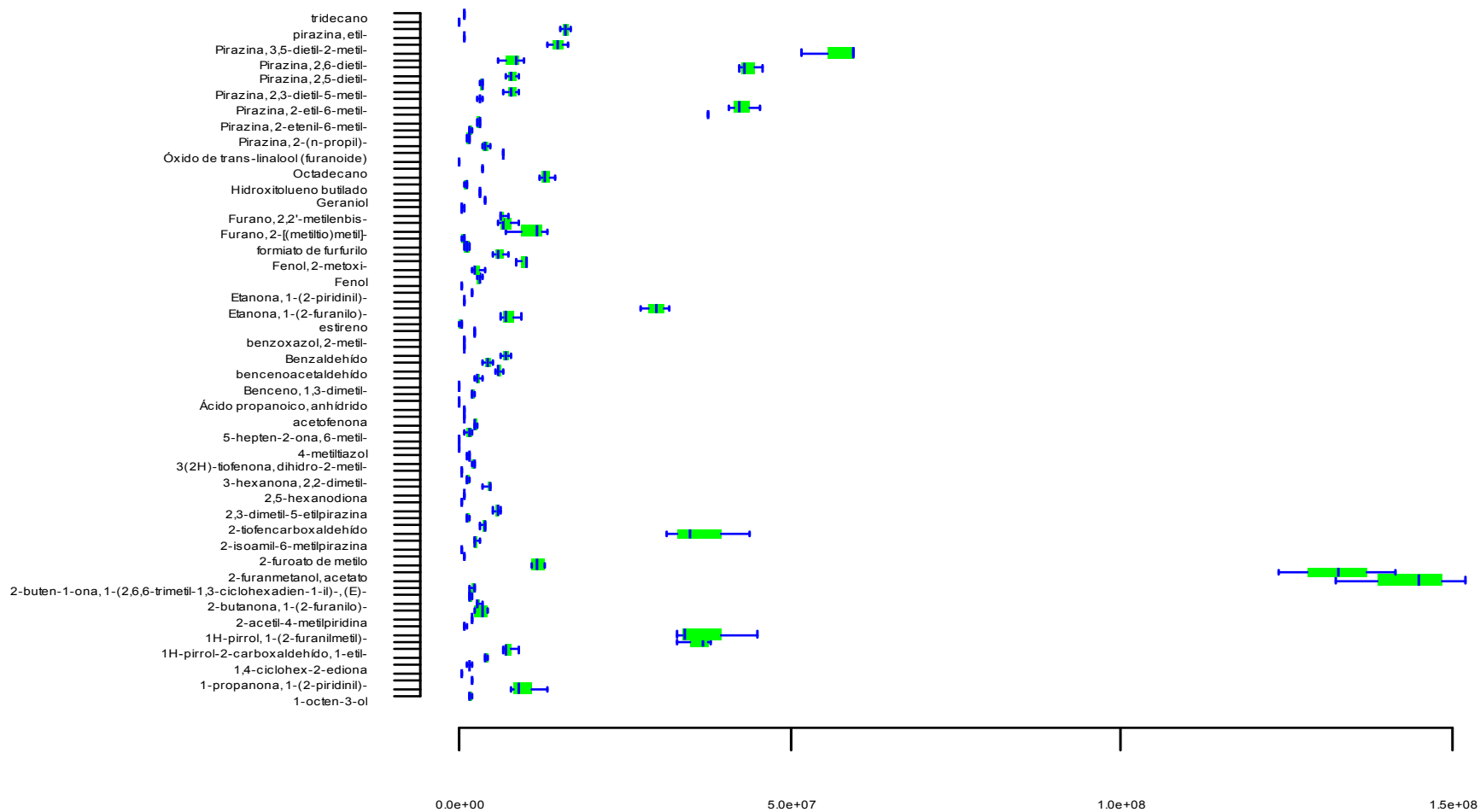


Figura 27

Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PNT-BC

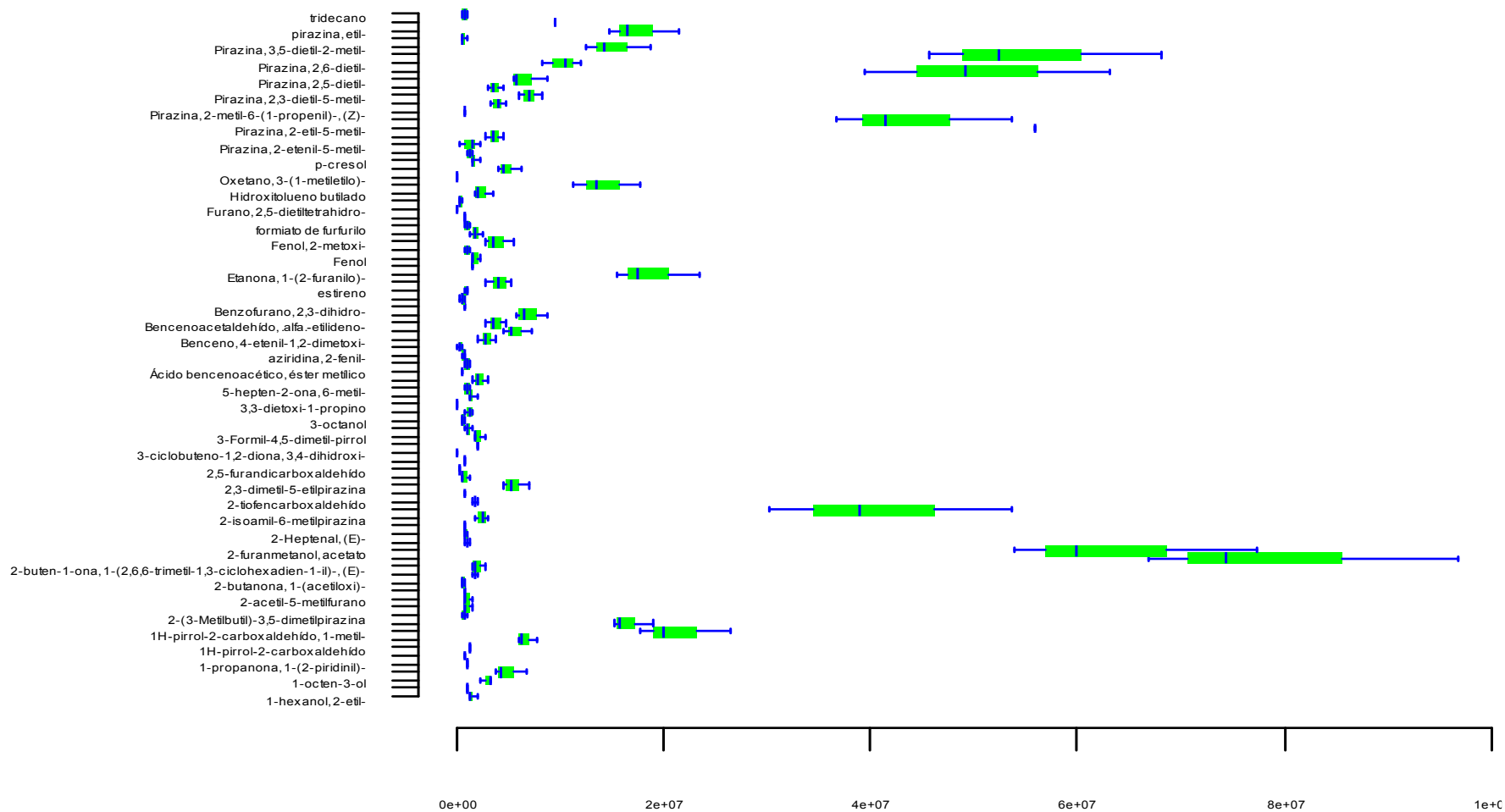


Figura 28

Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PT1-BC

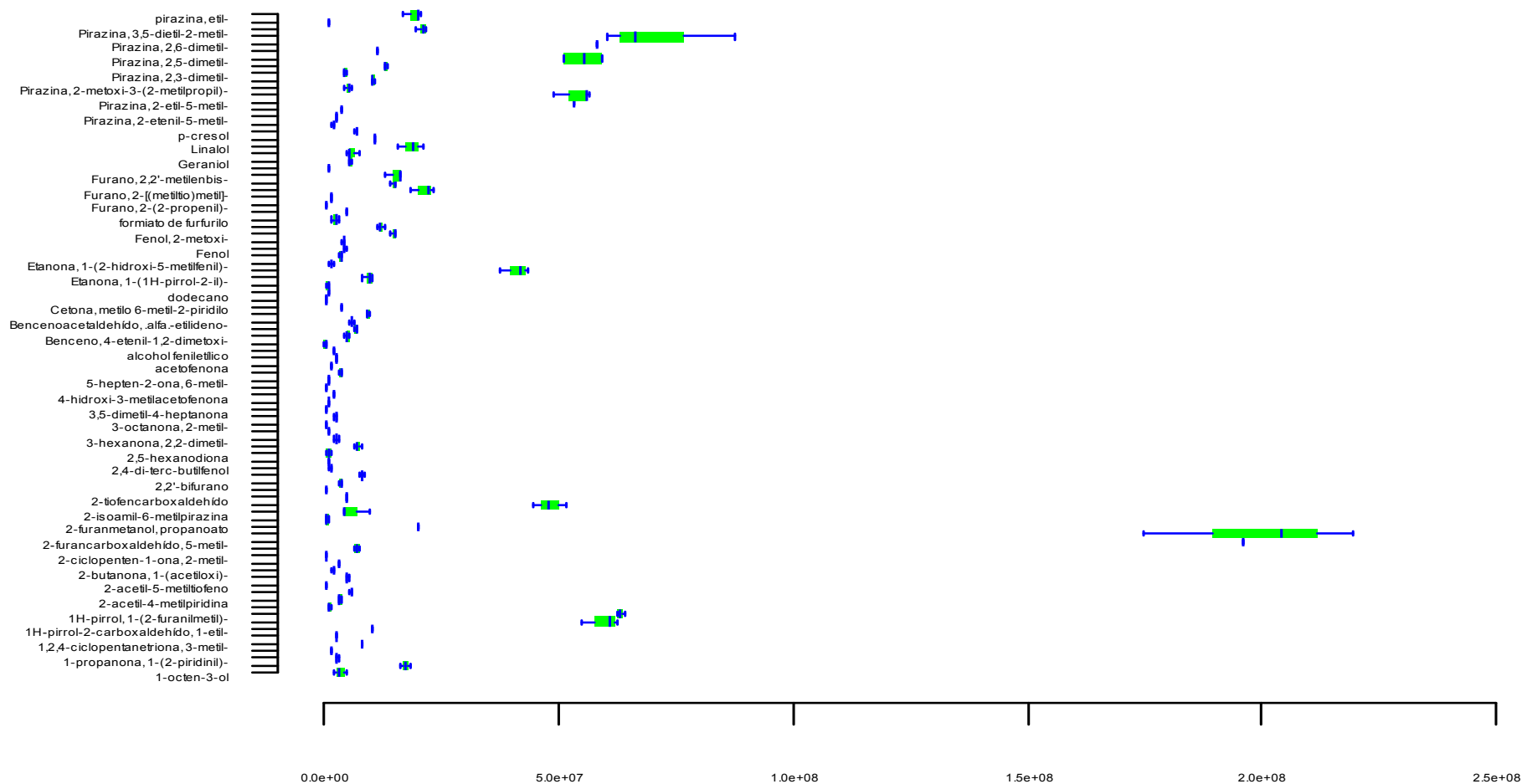


Figura 29

Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PT2-BC

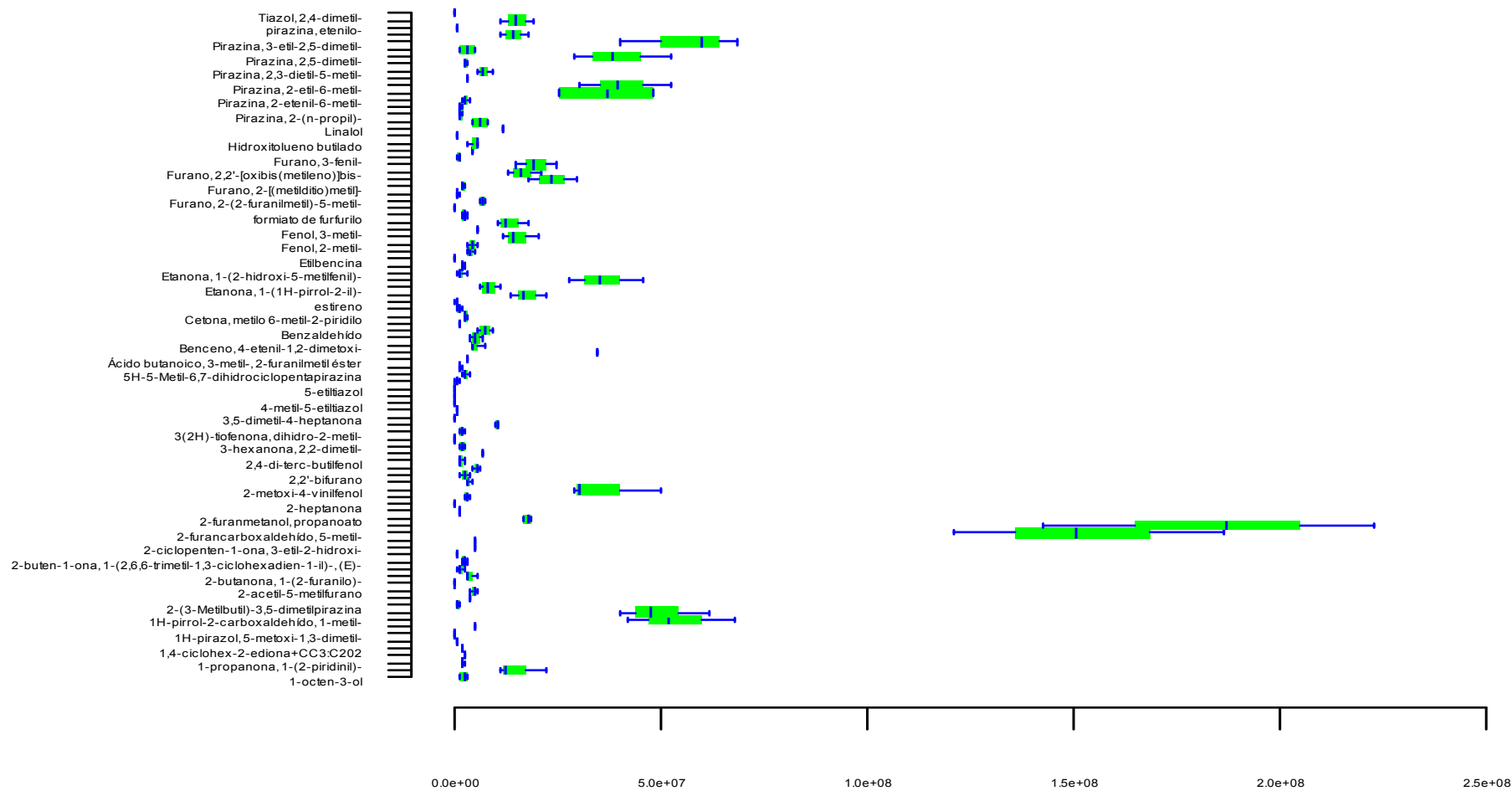


Figura 30

Diagrama de cajas y bigotes de los COV del GV

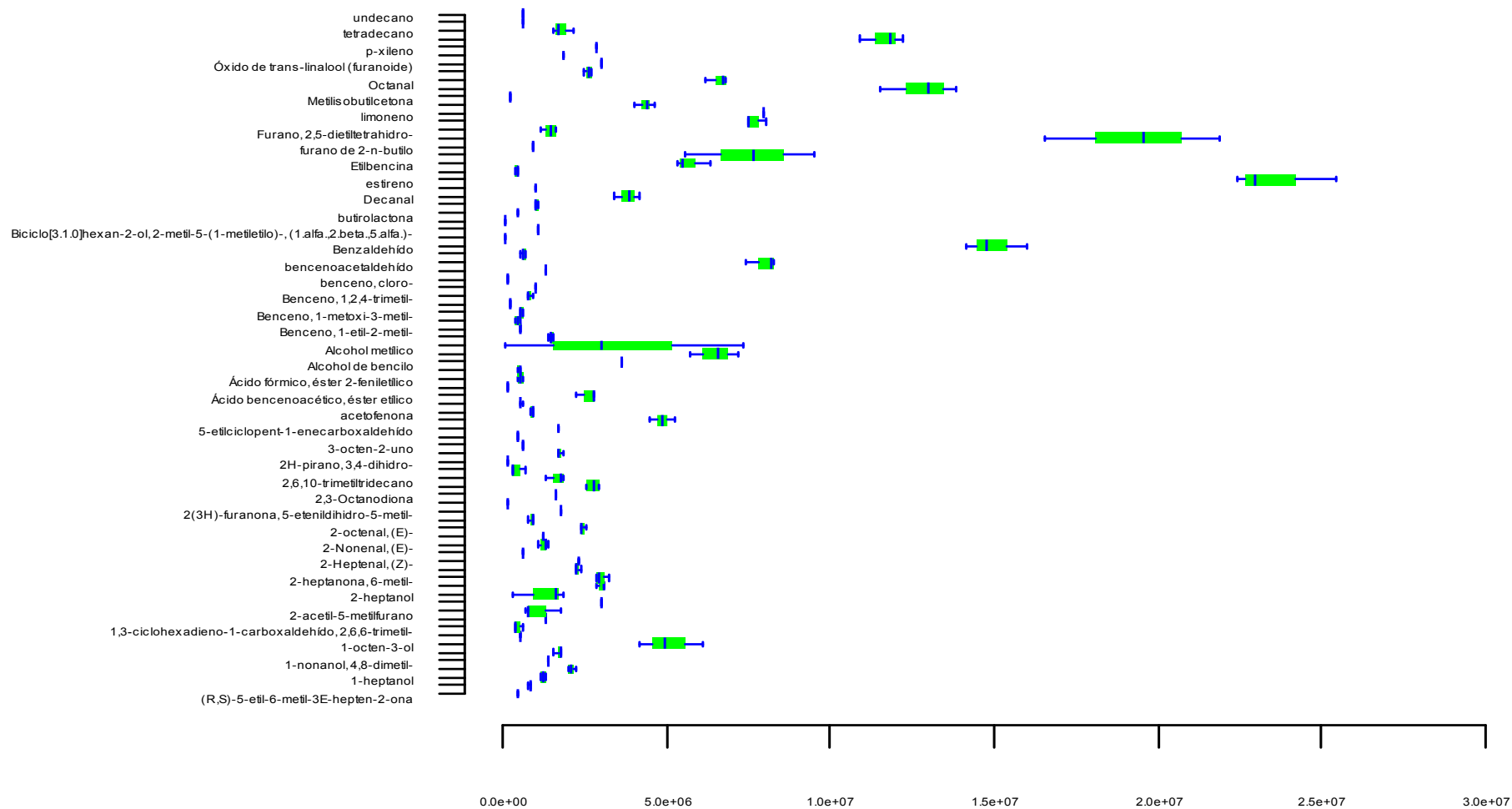


Figura 31

Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PNT-GV

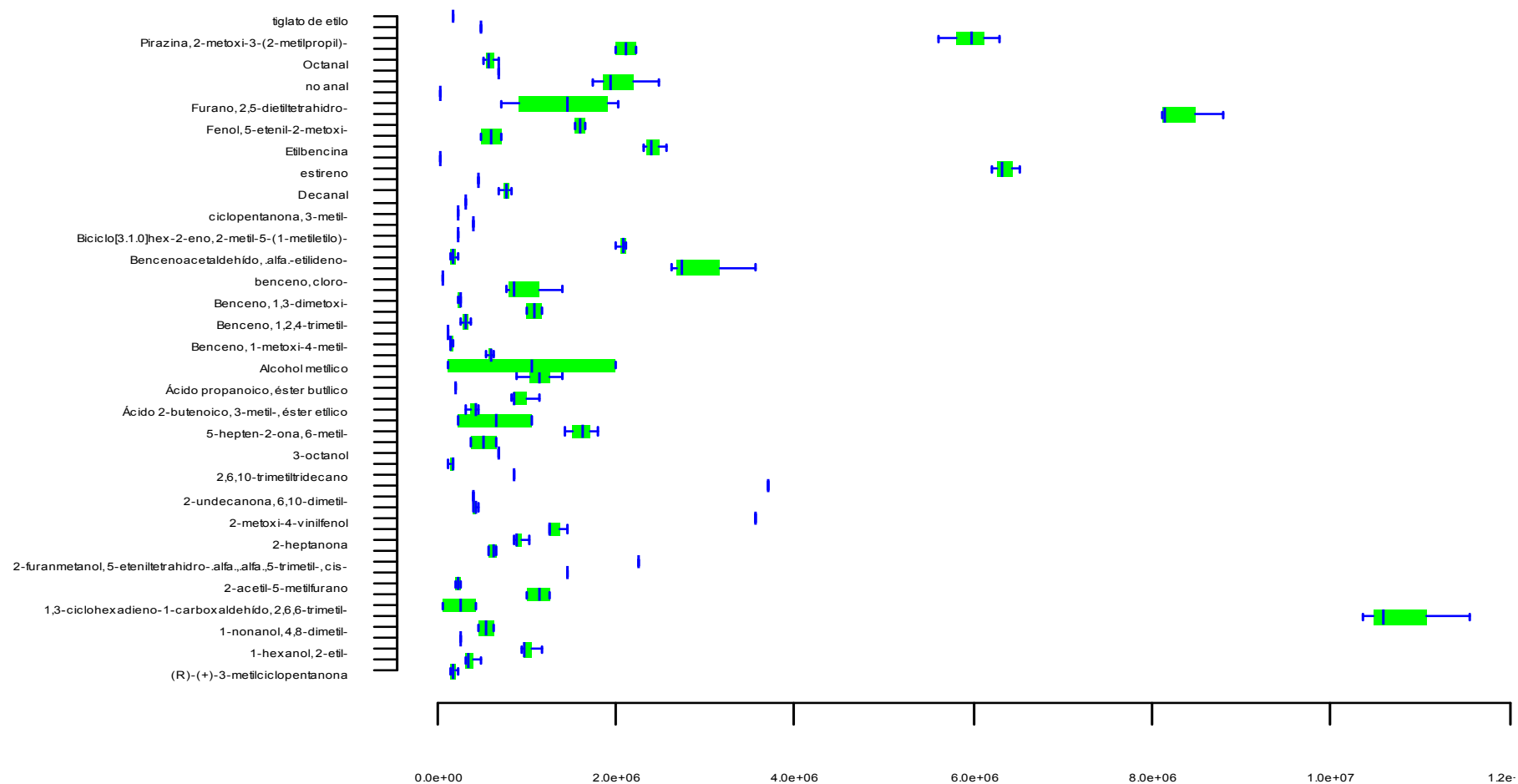


Figura 32

Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PT1-GV

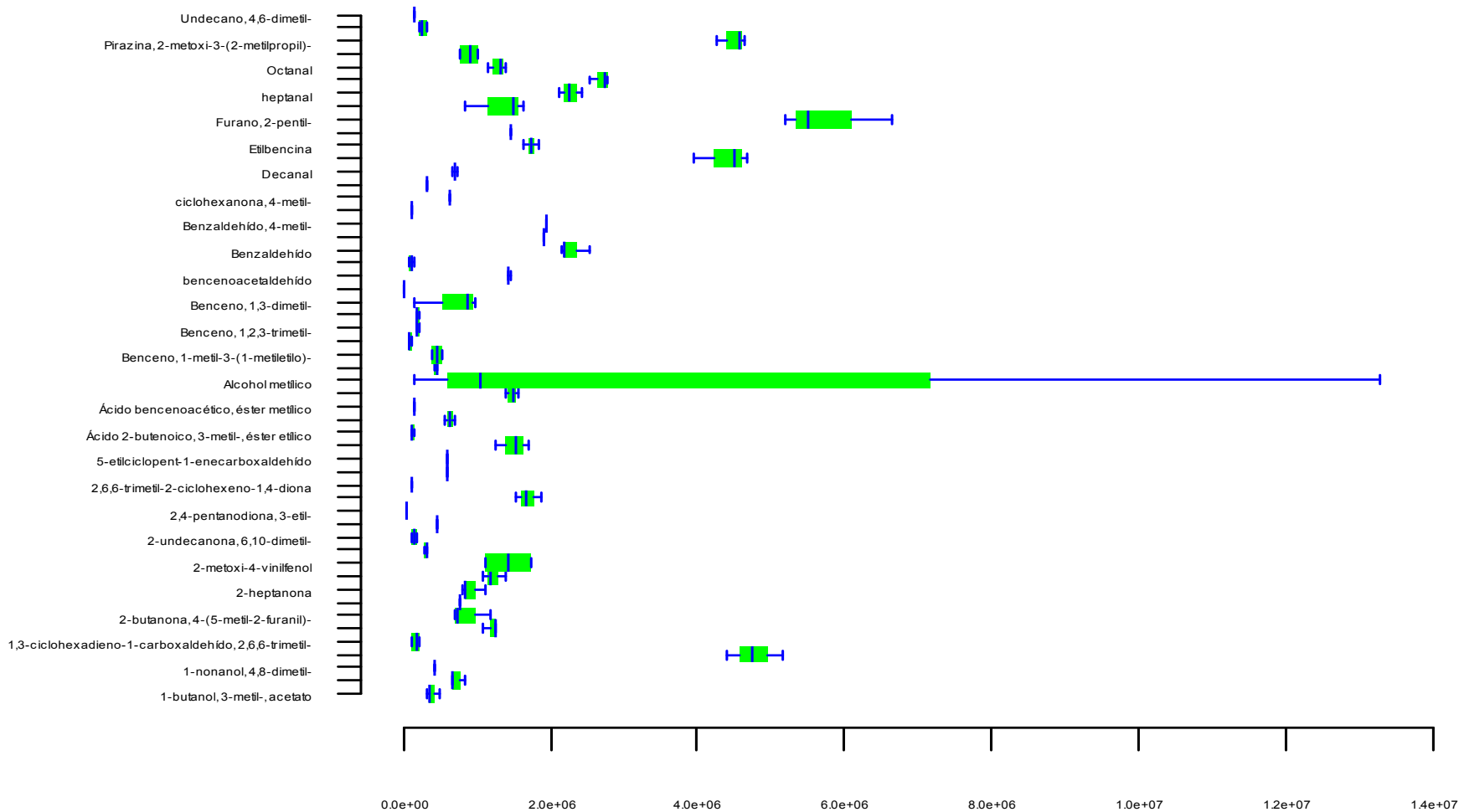


Figura 33

Diagrama de cajas y bigotes de los COV del PT2-GV

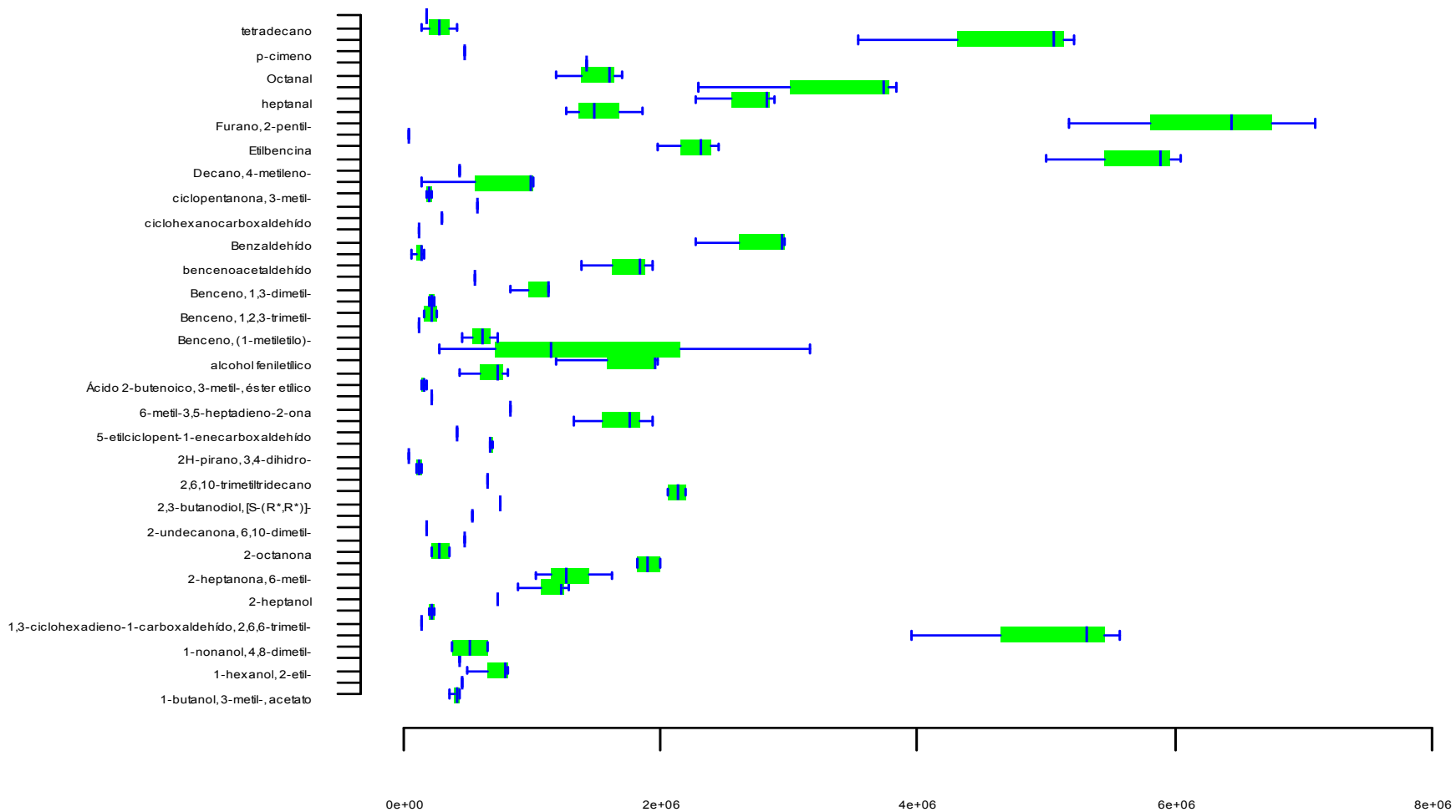


Figura 34

Diagrama de cajas y bigotes de los COV emitidos por el medio de cultivo CYA

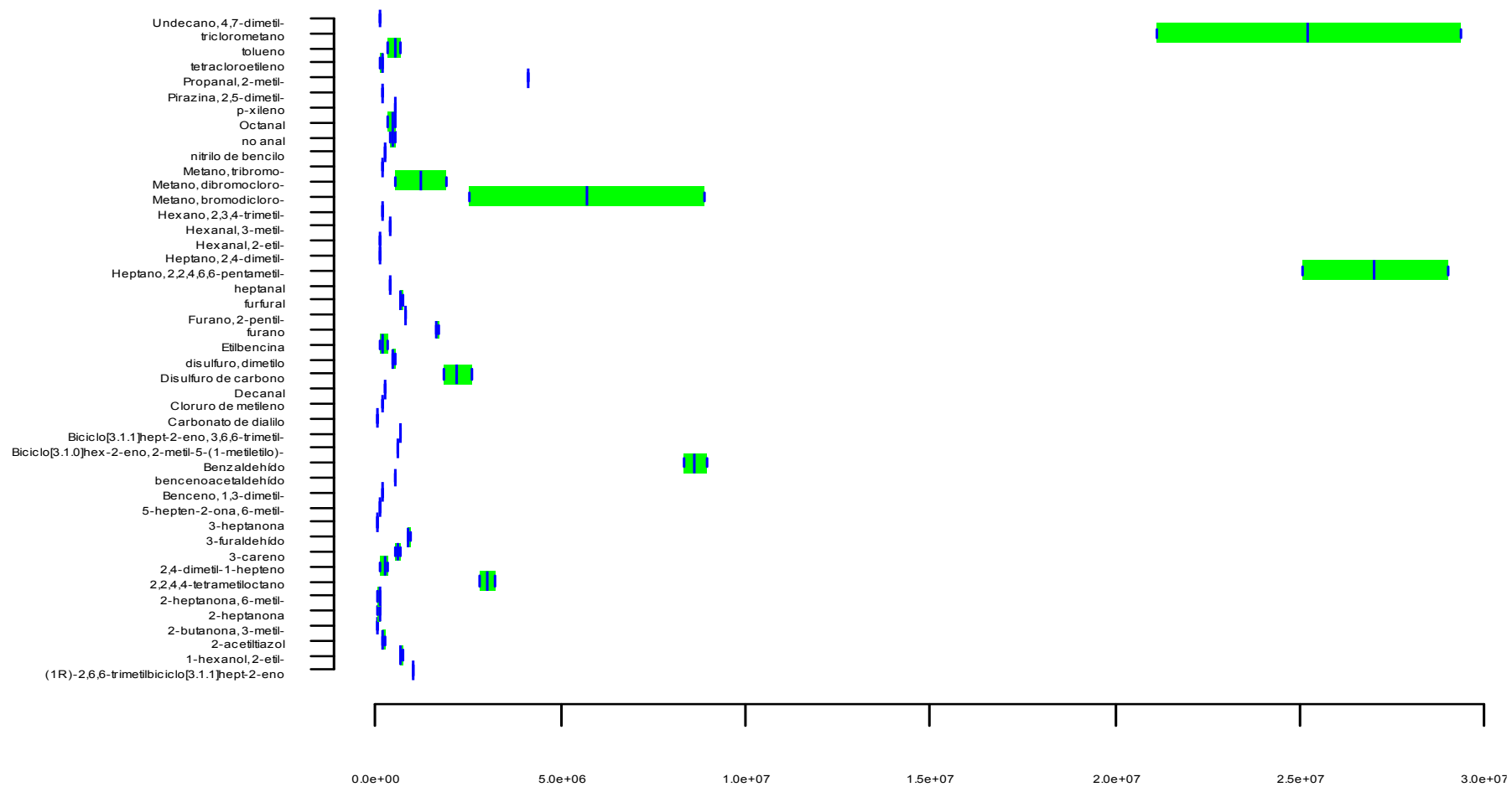


Figura 35

Diagrama de cajas y bigotes de los COV emitidos por el PNT-CYA

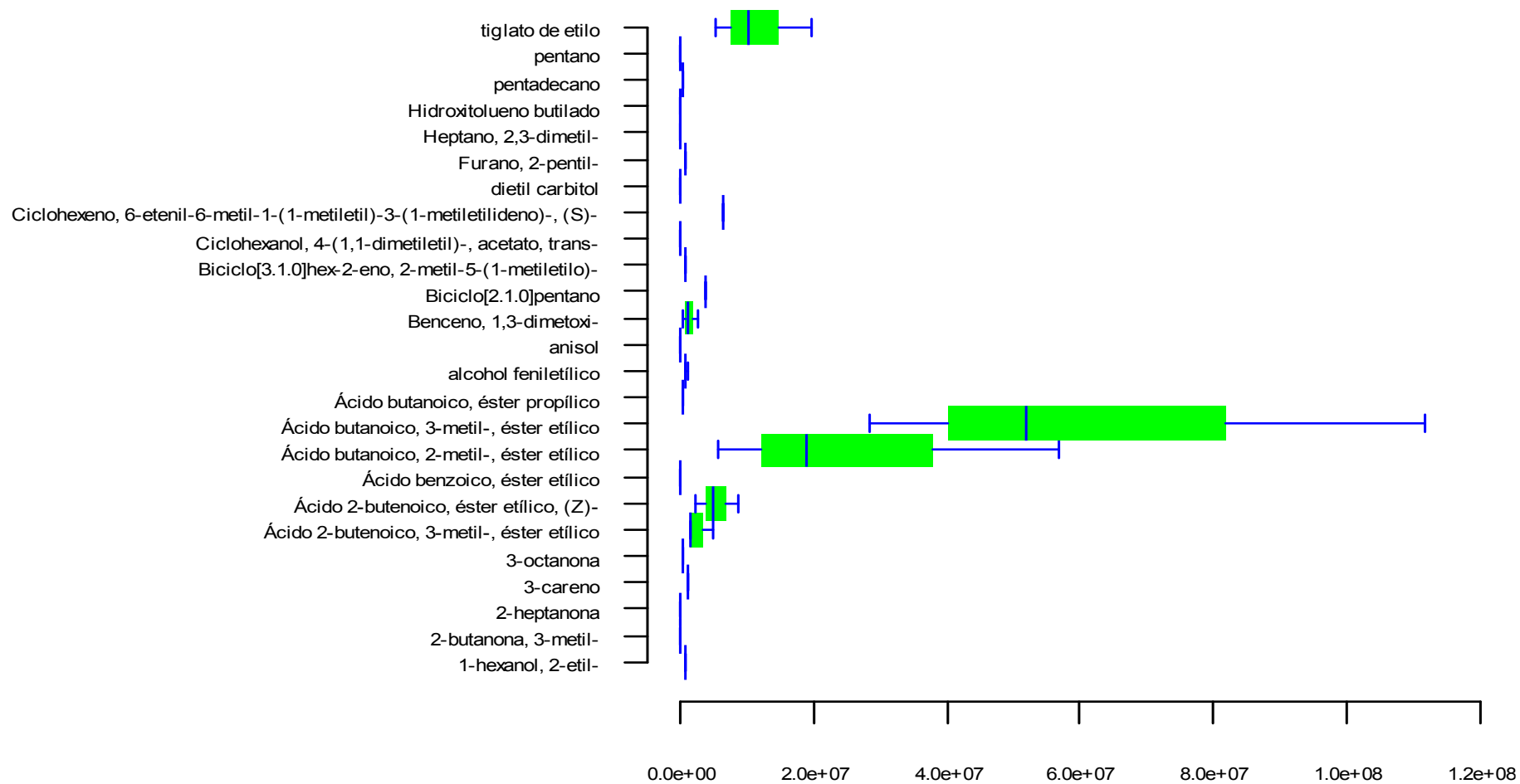


Figura 36

Diagrama de cajas y bigotes de los COV emitidos por el PT1-CYA

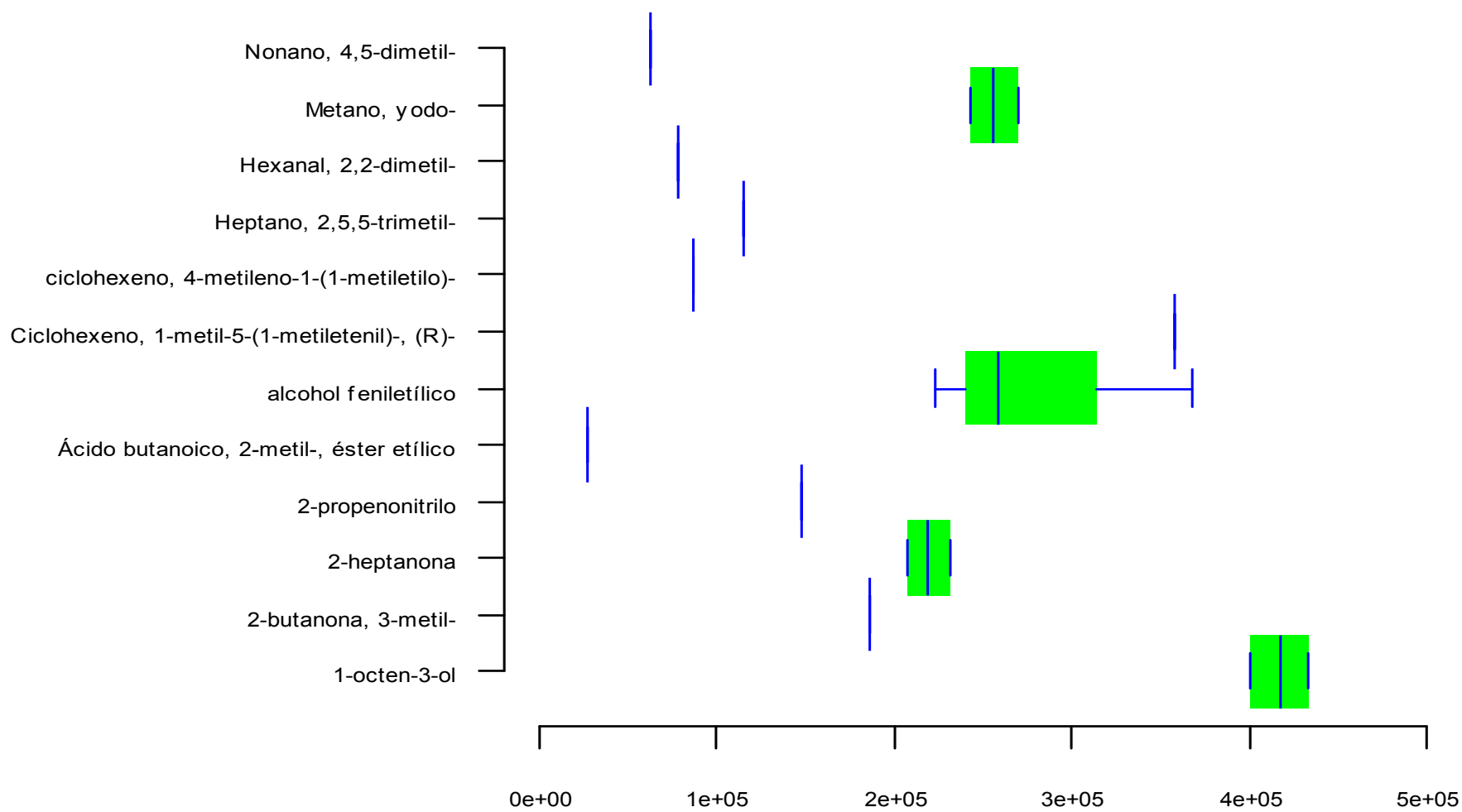


Figura 37

Diagrama de cajas y bigotes de los COV emitidos por el PT2-CYA

