

**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**

**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**

Autor: Bach. Jhon Danfer Davila Garcia

Asesores:

M. Sc. Aline Camila Caetano

Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova

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): Davila Garcia, Jhon Danfer
DNI N°: 74095299
Correo electrónico: jhondavi@legreco@gmail.com
Facultad: Facultad de 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

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

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Caetano, Aline Camila
DNI, Pasaporte, C.E N°: 001630352
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: Mansilla Cordova, Pedro Javier
DNI, Pasaporte, C.E N°: 41956401
Open Research and Contributor-ORCID (https://orcid.org/0000-0002-9670-0970) https://orcid.org/0000-0002-9560-7678

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_foro.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, 01, marzo, 2023

[Signature of author 1]

Firma del autor 1

Firma del autor 2

Aline Camila Caetano
Firma del Asesor 1

[Signature of asesor 2]
Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor y cariño incondicional, por sus sabios consejos en todo momento, por ser los pilares fundamentales en cada paso que doy en transcurso de mi vida, les dedico todo mi esfuerzo, en reconociendo a todos los sacrificios realizados para que pueda alcanzar mis metas.

Jhon Danfer Davila Garcia

AGRADECIMIENTO

A Dios por guiarme en la vida, por bendecir con salud, tranquilidad, amor y fortaleza a mis padres Marisol Gracia y Emerson Lopez y hacer posible que estén en los malos y buenos momentos haciendo que cada día sea una mejor persona.

A la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la UNTRM por contribuir en mi formación académica durante todo el periodo de mis estudios.

Al INDES-CES por dejarme desarrollar el proyecto con el uso de sus laboratorios.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal (LABISANV).

Al Laboratorio de la Clínica Fitopatológica, donde se llevó a cabo la ejecución del proyecto. A la M.Sc. Aline Camila Caetano y al Dr. Pedro Javier Masilla Córdova, por darme la oportunidad de ser partícipe de su equipo de investigación, por inculcar aptitudes y capacidades durante el desarrollo del proyecto.

Al ingeniero Segundo Grimaldo Chávez Quintana, por su apoyo, con la prestación de una incubadora, siendo esencial para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Natalie Verónica Rondinel Mendoza, por su gran apoyo en el desarrollo de los análisis estadísticos y en su interpretación.

A la Universidad Nacional de Jaén que, a través del 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, realizó la subvención para la tesis.

Finalmente, y no menos importante agradecer a mis amigos y compañeros de Laboratorio de la Clínica Fitopatológica, con quienes compartí muchas experiencias y júbilos durante muchos días de labor.

Jhon Danfer Davila Garcia

**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 AUQUIÑIVIN SILVA

DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Perfil de compuestos orgánicos volátiles de la bebida de café preparada con granos inactivados con un hongo toxigeno y uno no toxigeno determinado por GC-MS del egresado Jhon Danfer Davila Garcia de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería 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, 01 de marzo de 2023



Aline Camila Coetano

Firma y nombre completo del Asesor

Aline Camila Coetano

CE: 001630382



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 Perfil de compuestos orgánicos volátiles de los bebidas de café preparada con gran emulsionador con un hongo toxigénico y un oro toxigénico determinado por GC-MS del egresado Jhon Danyel David Barrios de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrícolas Escuela Profesional de Ingeniería 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, 01 de marzo de 2023



Firma y nombre completo del Asesor

Pedro Javier Mausilla Córdova
DNI 41956401



JURADO EVALUADOR DE TESIS



Dra.Sc. ELENA VICTORIA TORRES MAMANI

PRESIDENTE



Ms. ROBERT JAVIER CRUZALEGUI FERNANDEZ

SECRETARIO



Mg.Sc. ARMSTRONG BARNARD FERNANDEZ JERI

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:

Perfil de compuestos orgánicos volátiles de la bebida de café preparada con
grandes macerados con poca levadura y con un contenido determinado por GC-MS

presentada por el estudiante ()/egresado (✓) Thon Danier David Corrales

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

con correo electrónico institucional 3409529951@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 (✓) / 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, 04 de marzo del 2023

[Signature]
SECRETARIO

[Signature]
PRESIDENTE

[Signature]
VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....



ANEXO 3-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 21 de marzo del año 2023, siendo las 15:00 horas, el aspirante: Jhon Danfor Davila Garcia, asesorado por Lic. Mg. Sc. Aline Camila Caetano defiende en sesión pública presencial (X) / a distancia () la Tesis titulada: 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, para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: D. Sc. Elena Victoria Torres Mamani
Secretario: Mg. Robert Javier Cruzalegui Fernández
Vocal: Mg. Mg. Armstronge Bernard Fernandez Jeri

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 16:02 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

SECRETARIO (with signature)

VOCAL (with signature)

PRESIDENTE (with signature)

OBSERVACIONES:

ÍNDICE

RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCIÓN	18
II. MATERIAL Y MÉTODOS	20
2.1. Lugar de ejecución.....	20
2.2. Material de estudio	20
2.3. Determinación del método de esterilización de los granos de café.....	20
2.4. Porcentaje de humedad en granos de café esterilizados y sin esterilizar.....	21
2.5. pH de granos de café esterilizados y sin esterilizar	21
2.6. Siembra directa de granos de café	22
2.7. Porcentaje de infección de la siembra directa de granos de café.....	22
2.8. Aislamiento de hongos de los granos de café.....	22
2.9. Observación microscópica de los aislados fúngicos.....	24
2.10. Morfología e identificación de los aislados	25
2.11. Inoculación en medio CAM para evaluar la producción de extrolitos	25
2.12. Cultivo puro a partir de punta de hifa.....	25
2.13. Conteo de esporas	26
2.14. Inoculación de los microorganismos toxigénico y no toxigénico en los granos de café	27
2.15. Preparación de la bebida de café	27
2.16. Análisis de COV por GC-MS.....	27
2.16.1. De la bebida	27
2.16.2. De los microorganismos	28
2.16.3. Identificación de los compuestos volátiles	28
2.17. Análisis de datos	29

III.	RESULTADOS	30
3.1.	Esterilización granos de café	30
3.2.	Determinación de porcentaje de humedad de granos de café.....	30
3.3.	Determinación de pH de granos de café	31
3.4.	Porcentaje de infección de granos de café.....	31
3.5.	Aislamiento de hongos a partir de los granos de café	32
3.6.	Características macro y micro morfológicas de <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico y <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico	32
3.7.	Inoculación en medio CAM para la evaluación de la producción de extrolitos	34
3.8.	Cultivo puro a partir de punta de hifa.....	35
3.9.	Inoculación de <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico y <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico en los granos de café	36
3.10.	COV de la bebida	36
3.11.	COV de los microorganismos	48
IV.	DISCUSIÓN.....	52
V.	CONCLUSIONES.....	56
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Porcentaje de humedad de granos de café.....	31
Tabla 2 Granos sin ningún tratamiento (GSNT); autoclavado por 15 min (A15min); esterilización con oxido de propileno (OP)	31
Tabla 3 Descripción macroscópica y microscópica de los aislados de <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico (AT) y <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico (ANT).....	33
Tabla 4 Conteo de esporas de <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico (AT) y <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico (ANT)	36
Tabla 5 Análisis de valores propios de la matriz de correlación para los COV de la bebida de café.....	39
Tabla 6 Preliminares de determinación de porcentaje de humedad de granos de café..	67
Tabla 7 Preliminares de determinación de pH de los granos de café	67
Tabla 8 Preliminares de diluciones para la inoculación de <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico (AT); <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico (ANT) en los granos de café	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Siembra para aislamientos de microorganismos.....	23
Figura 2 Características micromorfológicas del género <i>Aspergillus</i> , barra de escala = 20 μm	24
Figura 3 A: Foto macroscópica de la cámara de Neubauer. B: Foto microscópica de los cuadrantes de la cámara de Neubauer con aumento de 40X y, C: con aumento de 400X	26
Figura 4 Siembra directa de granos de café almacenados en medio DG18, incubados a 25°C por 7 días, autoclavados a 121°C/15 min (A15min); autoclavado por a 121°C/1 h (A1h); esterilizado químicamente con óxido de propileno (EOP)); granos sin ningún tratamiento (GSNT).....	30
Figura 5 <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico (AT); <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico (ANT); después de 7 días de incubación a 25 °C.....	32
Figura 6 <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico (AT); <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico (ANT) después de 7 días de incubación a 25 °C; imágenes de cabezas conidiales con barras referencia de 40 μm (a, e) sin colorear, (b, f) coloreadas con fucsina ácida, (c, g) coloreadas con azul de lactofenol e imágenes (d, h) de los conidios sin colorear con barra referencia de 20 μm	33
Figura 7 Aislados pertenecientes al género <i>Aspergillus</i> sección Nigri, siendo el <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico que presenta fluorescencia (AT); <i>Aspergillus</i> sp toxigénico que presenta fluorescencia (AT); <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico que no presenta fluorescencia (ANT).	35
Figura 8 Observación del crecimiento de las hifas en el esteroscopio (A); corte de la punta de hifa (B).....	35
Figura 9 <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico (AT) y <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico (ANT); anverso (a); reverso (b); sembrados en medio CYA e incubados a 25°C por 10 días	36
Figura 10 Diagrama de cajas por COV identificados en las bebidas de café.....	37
Figura 11 Grado de correlación de los COV de la bebida según dimensión.....	38
Figura 12 Sedimentación de ACP de la bebida de café.....	39
Figura 13 Contribución de los COV de la bebida de café presentes en el componente principal 1	40
Figura 14 Contribución de variables (COV de la bebida de café) en el componente principal 2.....	40

Figura 15 Contribución de variables (COV de la bebida de café) en el componente principal 3.....	41
Figura 16 Doble proyección para COV y tratamientos (bebida de café)	42
Figura 17 Dendrograma de los agrupamientos de los COV de la bebida de café.....	43
Figura 18 Dendrograma de COV según agrupamiento por tratamientos	45
Figura 19 Dendrograma de COV según agrupamiento por tratamientos evidenciando un patrón de COV en los tratamientos resaltados	47
Figura 20 Diagrama de cajas por COV de los microorganismos estudiados	48
Figura 21 Doble proyección para COV y tratamientos (microorganismos).....	49
Figura 22 Dendrograma circular de los COV de los microorganismos	50
Figura 23 Dendrograma de los COV agrupados según tratamientos (microorganismos)	51
Figura 24 Identificación de microorganismos <i>Aspergillus</i> toxigenico y <i>Aspergillus</i> no toxigenico según clave dicotómica general de Pitt y Hocking, (2009) pag.55	65
Figura 25 Clave para especies de <i>Aspergillus</i> adaptado de Pitt y Hocking (2009), pág 277	66
Figura 26 Aislados fúngicos de granos de café almacenados sembrados en medio CYA e incubados a 25 °C por 7 días; <i>Penicillium</i> spp. (24, 26, 33, 35a, 37, 38, 23, 311, 29,21, 312, 36 y 43); <i>Aspergillus</i> spp. (26, 35b, 421, 310, 32 y 421); <i>Fusarium</i> spp. (471 y 472).	68
Figura 27 <i>Aspergillus</i> sp. no toxigénico (ANT); <i>Aspergillus</i> sp. toxigénico (AT); medio DG18 °; a los 2 días (a); a los 4 días (b) de incubación a 25°C.	73

RESUMEN

El café arábico es uno de los principales productos de exportación del Perú y, la bebida preparada con ello es una de las más consumidas en el mundo. Al igual a que otros granos, está expuesto a la contaminación por hongos en las etapas de postcosecha que pueden afectar su calidad. Algunos de estos microorganismos pueden inclusive producir toxinas. El propósito del presente trabajo fue determinar la diferencia que podría haber entre una bebida de café previamente contaminada con una cepa de *Aspergillus* toxigénica, una no toxigénica con respecto a otra naturalmente expuesta a microorganismos, pero no inoculada, y otra esterilizada antes de preparar la bebida. La hipótesis trabajada fue que las cepas toxigénicas o no toxigénicas de *Aspergillus*, o en todo caso, cada uno de los tratamientos producen volátiles característicos. Para esto, granos verdes de *Coffea arabica* de la región fueron sometidos a los diferentes tratamientos, procesadas de la manera más próxima a la forma convencional, pero en laboratorio, y los volátiles fueron determinados por cromatografía de gases acoplada a detector de masas (GC-MS). La cepa de *Aspergillus* toxigénico fue determinada por la fluorescencia en agar coco (CAM). Los resultados, como esperado, consisten en una compleja variedad de hasta 87 compuestos orgánicos volátiles (COV). No necesariamente alguno de ellos fue encontrado asociado a los tratamientos. Sin embargo, es posible que con un análisis más detallado a futuro se identifique, sino un marcador químico, cantidades en el perfil de compuestos que permitan alcanzar la propuesta inicial de diferenciar químicamente las distintas calidades de café, con implicancias comerciales y de inocuidad alimentaria.

Palabras claves: micotoxinas, COV, *Aspergillus*, GC-MS

ABSTRACT

Arabica coffee is one of the main export products of Peru and the drink prepared with it is one of the most consumed in the world. Like other grains, it is exposed to fungal contamination in the post-harvest stages that can affect its quality. Some of these microorganisms can even produce toxins. The purpose of this study was to determine the difference that could exist between a coffee drink previously contaminated with a toxigenic *Aspergillus* strain, a non-toxicogenic one with respect to another naturally exposed to microorganisms, but not inoculated, and another sterilized before preparing the drink. The hypothesis worked was that the toxigenic or non-toxicogenic strains of *Aspergillus*, or in any case, each one of the treatments produce characteristic volatiles. For this, green beans of *Coffea arabica* from the region were subjected to the different treatments, processed in the closest way to the conventional way, but in the laboratory, and the volatiles were determined by gas chromatography coupled to a mass detector (GC-MS). Toxigenic *Aspergillus* strain was determined by fluorescence on coconut agar medium (CAM). The results, as expected, consist of a complex array of up to 87 volatile organic compounds (VOC). Not necessarily any of them was found associated with the treatments. However, it is possible that more detailed analyzes in the future will identify, if not a chemical marker, amounts in the compound profile that allow reaching the initial proposal of chemically differentiating the different qualities of coffee, with commercial and food safety implications.

Keywords: mycotoxins, COV, *Aspergillus*, GC-MS

I. INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica*) incluye más de 103 especies de árboles y arbustos tropicales (Ferrão et al., 2015). El Perú representa el sexto país en producción mundial de café después de Brasil, Vietnam, Indonesia, Colombia, Etiopía (Chauhan et al., 2015). La comercialización del café representa una cadena de valor relativamente integrada con canales de empresas y cooperativas (Vargas et al., 2021).

Los aromas y sabores agradables del café son generados principalmente durante el tostado. Sin embargo, la calidad del grano verde, que contiene los precursores de los aromas y sabores, es de gran importancia para la formación de los volátiles deseables (Poisson et al., 2018). El proceso de tostado tiene un impacto significativo en el café (Freitas & Mosca, 1999), factores como la temperatura y tiempo de tostado, potencializan y desarrollan la formación del sabor y el aroma de los granos de café (Lee et al., 2015; Takeoka et al., 1988). Compuestos volátiles como alcoholes, cetonas, ésteres pueden ser detectados principalmente durante el proceso de secado del café (Zhang et al., 2022) y compuestos heterocíclicos que proporcionan los sabores distintivos (Lee & Shibamoto, 2002). En la evaluación de diferentes grados de tostado de café, se observó variación en las concentraciones de los ácidos volátiles, alcoholes, ésteres e hidrocarburos siendo mayores en el café poco tostado. Los terpenoides fueron encontrados en mayores concentraciones en café muy tostado, enfatizando la influencia del tostado en el desarrollo de la fracción volátil (Alamri et al., 2022).

No obstante, los granos de café, al igual que otros cultivos, pueden contaminarse con microorganismos durante las diferentes etapas de cultivo, cosecha, procesamiento, transporte y almacenamiento (Nakajima et al., 1997; Silva et al., 2000). Características como el clima, temperatura, actividad de agua, variedad, origen geográfico, entre otros factores permiten el desarrollo de ciertas especies hongos que se encuentran desde la postcosecha hasta el almacenamiento (Marroquín-Cardona et al., 2014; Silva et al., 2008).

Durante el procesamiento de café es posible el desarrollo de microorganismos muy diversos como hongos filamentosos, levaduras, bacterias ácido lácticas y pectinolíticas en las diferentes etapas y subproductos generados (Silva et al., 2008) Estos contribuyen al aroma único de muchos productos (Pereira et al., 2017) pero también pueden favorecer

a los malos olores si sus actividades y periodos de desarrollo en el cultivo o en su transformación no son controlados (Chiotta et al., 2020; Jeleń & Wąsowicz, 2009). Estos problemas pueden ser exacerbados por malas prácticas de manejo postcosecha (Odjo et al., 2022).

Asimismo, muchos de estos microorganismos pueden producir compuestos orgánicos volátiles generados principalmente a partir de isoprenoides, fenilpropanoide, aminoácidos y ácidos grasos (Goff & Klee, 2006). Algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* pueden sintetizar la ocratoxina A, una micotoxina potencialmente nefrotóxica y que se produce a temperaturas entre 25 y 35 °C (Magan, 2006; Paterson et al., 2014). Las micotoxinas son metabolitos secundarios (Zhu et al., 2015), con estructuras que van desde simples anillos heterocíclicos hasta moléculas complejas de varios carbonos (Motarjemi, 2013). Estas moléculas no suelen volatilizarse, sin embargo, podrían estar asociadas a algún compuesto de la vía metabólica de los hongos que es volátil y actuar como un marcador de la presencia de la micotoxina o del microorganismo toxigénico (Pennerman et al., 2016).

La cromatografía de gases es una técnica de alta selectividad y eficiencia en la separación de compuestos volátiles termicamente estables en las temperaturas elevadas que son utilizadas durante el proceso de separación cromatográfico. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permite escanear la muestra para detectar los compuestos presentes que sean ionizados por la ionización por impacto de electrones (Chiaradia et al., 2008).

En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el perfil de compuestos orgánicos volátiles (COV) de la bebida de café producida con granos inoculados con un aislado del género *Aspergillus* toxigénico y uno no toxigénico, así como los COV producidos por estos microorganismos, utilizando el cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas (GC-MS).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se llevó a cabo en el área de la Clínica Fitopatológica, que funciona en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Sanidad Vegetal (LABISANV) y en Laboratorio de Investigación en Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG) del 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

Los granos de café (*Coffea arabica*), variedad Catimor, fueron recolectados del caserío de Ortiz Arrieta (6°02'24.7"S 78°22'13.5"W), del distrito de Lonya Grande, de la provincia de Utcubamba. Aproximadamente 10 kilos de granos de café en pergamino fueron utilizados para todas las pruebas preliminares y los análisis detallados a seguir. En el laboratorio, los granos fueron mezclados sobre una mesa limpia y las impurezas más notables fueron retiradas. Submuestras de 500 g fueron separadas en bolsas de polietileno con cierre hermético. Todo el material fue mantenido a -20 °C, mientras duró el experimento. Las submuestras fueron utilizadas para los diferentes ensayos, conforme fueron requeridas.

2.3. Determinación del método de esterilización de los granos de café

Con la finalidad de evitar la influencia de otros microorganismos ya presentes en los granos, y que podrían competir con los aislados inoculados, se esterilizó 150 g de café por calor húmedo (autoclavado) a 121 °C por 1 h y 121 °C por 15 min y, en seguida, la muestra fue colocada en una estufa a 37 °C por 48 h para el secado de los granos.

La esterilización química fue realizada con óxido de propileno. Para ello, 230 g de café contenidos dentro de una placa de Petri de 150 mm × 20 mm fueron introducidos en una bolsa de polipropileno conteniendo también un pedazo de algodón embebido con 1 ml del producto. Los granos fueron de esa forma fumigados por 48 h a temperatura ambiente (Alfenas & Mafia, 2007).

En medio de cultivo Agar Dichloran 18% Glycerol (DG18) se realizó la siembra directa de 30 granos de café en 3 placas de Petri, 10 granos por cada placa, para verificar la ausencia de microorganismos y la efectividad de los procedimientos de esterilización.

2.4. Porcentaje de humedad en granos de café esterilizados y sin esterilizar

Para determinar los posibles efectos indirectos de los métodos de esterilización en los granos, el porcentaje de humedad de los granos de café fueron evaluados con el grano pilado y molido, según Sualeh et al. (2020), con algunas modificaciones. Una vez obtenida la muestra fina de café, se pesó 2 g y se llevó a estufa (marca BINDER, modelo FD 23 L) a 136 °C por 1 h. La muestra se colocó en una campana desecadora hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se realizó el pesado y, en seguida, se colocó la muestra nuevamente en la estufa por 1 hora más. Esto se repitió por tres veces hasta obtener el peso estable/constante de la muestra. La pérdida de peso se calculó como la pérdida de humedad y el valor se expresó en porcentaje de acuerdo con la ecuación 1.

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

Donde:

P_i: peso inicial (g) de la muestra

P_f: peso final (g) de la muestra

P_p: peso (g) del papel aluminio

2.5. pH de granos de café esterilizados y sin esterilizar

Con el mismo objetivo del análisis de humedad, se realizó la medición del pH de los granos de café conforme descrito por Araújo et al. (2020). Se pesó 20 g de la muestra molida, se añadió 100 ml de agua destilada y se mezcló. Posteriormente, se dejó decantar por 30 minutos, y el pH fue medido utilizando un potenciómetro digital (Orion Star A215).

2.6. Siembra directa de granos de café

La siembra directa de los granos de café sin esterilizar fue realizada de acuerdo con la metodología de Pitt y Hocking (2009). Antes de la siembra, en un vaso de precipitado, 40 granos fueron desinfectados superficialmente al ser sumergidos por 1 min en una solución de hipoclorito de sodio al 0.4% con el objetivo de eliminar la carga microbiana externa y garantizar el crecimiento de solamente los hongos que fueron capaces de penetrar en el grano. La siembra de los granos fue realizada en placas de Petri con medio de cultivo DG18. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 4 días.

2.7. Porcentaje de infección de la siembra directa de granos de café

Después del período de incubación, se realizó el conteo de todos los granos de café que presentaron crecimiento de hongos y el porcentaje de infección fue calculado mediante la ecuación 2 como descrito por Pitt y Hocking (2009).

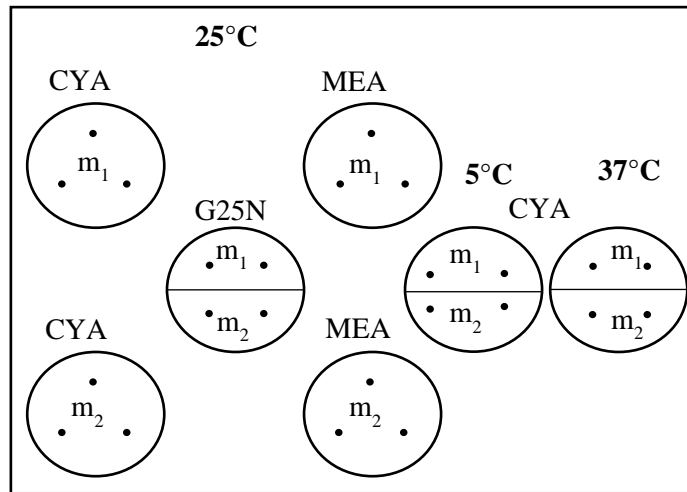
$$\% \text{ infección} = \frac{\text{número de granos infectados}}{\text{número de granos evaluados}} \times 100 \quad (2)$$

2.8. Aislamiento de hongos de los granos de café

Las colonias fúngicas que se desarrollaron en los granos de café fueron observadas en el estereoscopio y sustraídas individualmente con una aguja de inoculación a tubos de polipropileno para microcentrífuga conteniendo 250 µl de agar semilíquido al 0.2%. Los aislados fueron sembrados en placas de Petri con medios Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) y Agar Extracto de Malta (MEA) en tres puntos equidistantes del centro, del borde y entre sí. En Agar Nitrato Glycerol al 25% (G25N), dos colonias por placa fueron sembradas con 2 puntos cada una e incubadas a 25 °C por 7 días. Además, como controles, también se inoculó en medio CYA dos aislados por placa y se incubó a 5 °C y 37 °C durante 7 días (Figura 1).

Figura 1

Siembra para aislamientos de microorganismos



Nota. Adaptada de Pitt y Hocking (2009).

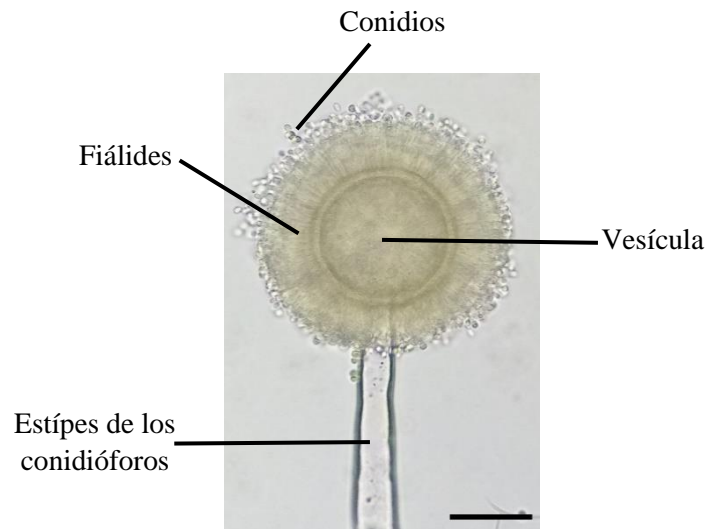
m_1 (microorganismo 1) y m_2 (microorganismo 2).

De algunos aislados fúngicos se evaluó sus características macromorfológicas, como textura, color del micelio, exudados, reverso de la colonia. Asimismo, el diámetro de cada una de las colonias fue medido diariamente con vernier, hasta antes que las colonias se sobrepongan.

Las características micromorfológicas de los aislados del género *Aspergillus* (Figura 2), como la forma de los conidios, color del estipe y dimensión, forma y textura del estipe, vesículas, fiálides y conidios fueron observadas y fotografiadas con la ayuda de un microscopio de luz (Primo Star ZEIZZ) (Samson et al., 2014).

Figura 2

Características micromorfológicas del género *Aspergillus*, barra de escala = 20 μm



Nota. Adaptada de Pitt y Hocking (2009).

2.9. Observación microscópica de los aislados fúngicos

Para la visualización de las estructuras microscópicas se realizaron montajes de las colonias fúngicas. En una lámina portaobjeto, se colocó una gota de ácido láctico, que es un buen fluido de montajes microscópicos y que permite visualizar el color natural de las estructuras del hongo, y una pequeña porción del hongo retirada de la colonia utilizando un asa de siembra fue colocada sobre el ácido. Una gota de alcohol 70%, utilizado para dispersar las esporas y conidios además de prevenir burbujas, fue adicionada sobre la porción del microorganismo y sobre ello una laminilla cubreobjeto. Se observó en el microscopio las estructuras de los hongos para la identificación del microorganismo y, así, realizar el repique de la colonia de interés.

Se realizó la técnica del microcultivo descrito por Alfenas y Mafia (2016) para observar estructuras limpias, claras y completas en los montajes realizados. Para el microcultivo se utilizó placas de Petri que contenían papel toalla húmedo cubriendo el fondo de la placa, ambos esterilizados. Sobre el papel, fueron colocadas varillas de vidrio en forma triangular y, sobre las varillas, la lámina portaobjeto. Un cubo de medio MEA, de aproximadamente 1 \times 1 cm, fue depositado sobre la lámina portaobjeto. La siembra del aislado fue realizada en los cuatro lados del cubo, en seguida, la laminilla cubreobjeto fue colocada sobre el cubo de medio de cultivo. La placa fue tapada, rotulada y sellada con

film plástico. El microcultivo fue incubado a 25 °C y observado todos los días hasta obtener una imagen clara de la estructura de fructificación del hongo.

2.10. Morfología e identificación de los aislados

Los aislados fueron caracterizados e identificados a nivel de sección utilizando la clave dicotómica general de Pitt y Hocking (2009) descrita en la Figura 23 de los anexos, principalmente en base a sus características macro y microscópicas. La clave específica para el género *Aspergillus* se encuentra en la Figura 24 de los anexos.

2.11. Inoculación en medio CAM para evaluar la producción de extrolitos

Además, como una forma rápida para la determinación de producción de micotoxinas, las cepas aisladas e identificadas por los protocolos específicos, a través de sus características y en base a literatura, fueron inoculadas en el centro de la placa con medio agar coco (CAM) e incubadas a 30 °C por 5 días, conforme descrito por Kuntawee y Akarapisan (2015) y Lin y Dianese (1976). Después de este período, se observó las placas bajo luz ultravioleta de 366 nm de longitud. Las cepas que presentaron un color azul fluorescente al ser observadas por el lado reverso de la colonia fueron consideradas como productoras de aflatoxinas u ocratoxina.

2.12. Cultivo puro a partir de punta de hifa

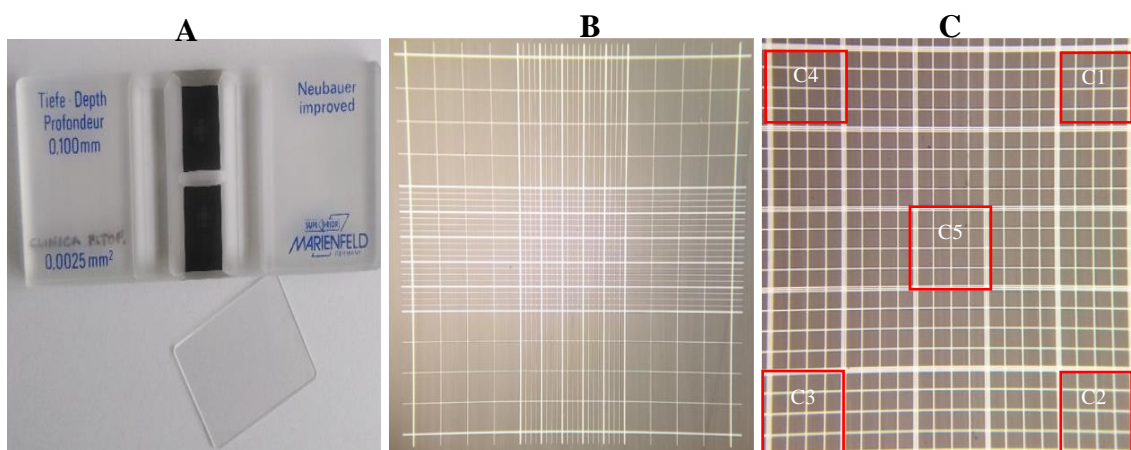
A partir de los aislados fúngicos obtenidos (*Aspergillus* sp. toxigénico y *Aspergillus* sp. no toxigénico), se aisló una sola espora para la obtención de cultivos puros (Alfenas & Mafia, 2007). Para ello, se sembró una masa de esporas en una gota de 10 µl de solución de Tween 20 al 0.05%, depositada previamente en la superficie del medio agar agua sólido (agar al 5%) contenido en una placa de Petri estéril y se ejecutó la técnica de siembra de esporas por agotamiento (estrías). La solución de Tween fue utilizada para esparcir las esporas por su propiedad surfactante. Las placas fueron incubadas a 25 °C y se observó la germinación de las esporas a las 24 h. Las esporas en germinación fueron observadas en el estereoscopio y, con ayuda de una lámina de bisturí n° 10, el agar conteniendo la espora en germinación fue cortado y transferido, con una aguja de inoculación, a otra placa de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) e incubado a 25 °C por 5 días. Posteriormente, se repicó a medio CYA y se incubó a 25 °C por 10 días. Sólo un cultivo monospórico de cada aislado fúngico fue utilizado para todos los ensayos.

2.13. Conteo de esporas

Para determinar la dilución adecuada y obtener una suspensión de 10^6 esporas/ml, se adicionó 30 ml de solución de Tween 20 al 0.05% a cada placa de Petri con el cultivo monospórico con 10 días de incubación y con una espátula de Drigalsky se realizó el raspado de la colonia. Toda la solución de la placa fue filtrada utilizando una gasa estéril para obtener una suspensión con solamente las esporas, sin hifas. A partir de esta suspensión fueron realizadas diluciones seriadas añadiendo 200 μ l del filtrado en tubos de ensayo con 1800 μ l de agua destilada estéril. El conteo de esporas fue realizado utilizando una cámara de Neubauer (Figura 3) y un microscopio de luz.

Figura 3

A: Foto macroscópica de la cámara de Neubauer. B: Foto microscópica de los cuadrantes de la cámara de Neubauer con aumento de 40X y, C: con aumento de 400X



Nota. C1, C2, C3, C4, C5 indican los cuadrantes donde se realizó el conteo de las esporas para la inoculación.

Para calcular el número de esporas inoculadas se utilizó la ecuación 3 y los cuadrantes utilizados para el conteo de las esporas en cámara de Neubauer se puede ver en la Figura 3C.

$$\left[\left(\left(\frac{C1 + C2 + C3 + C4 + C5}{5} \right) 25 \right) 10^4 \right] = \frac{\text{esporas}}{\text{ml}} \quad (3)$$

2.14. Inoculación de los microorganismos toxigénico y no toxigénico en los granos de café

La suspensión de esporas diluida en la cual fue contada 10^6 esporas/ml (item 2.13) fue utilizada para la inoculación de los granos de café. Los granos esterilizados (150 g) fueron mantenidos en un matraz de 500 ml debidamente desinfectado previamente con hipoclorito de sodio al 0.4%. Dos mililitros de la suspensión de esporas de cada cultivo puro de *Aspergillus* sp. toxigénico y de *Aspergillus* sp. no toxigénico fue agregado por separado a cada matraz con los granos de café. Además, 3 ml de agua estéril fueron adicionados para aumentar la actividad de agua de la muestra y favorecer el crecimiento fúngico. Para los controles (café sin esterilizar y café esterilizado sin inocular), 5 ml de agua estéril fueron adicionados. Las muestras fueron incubadas a 25 °C por 7 días (Iamanaka et al., 2014).

2.15. Preparación de la bebida de café

El procesamiento del grano de café y la preparación de la bebida fueron realizados como mencionado por Sanchez y Chambers (2015), con modificaciones. Los granos de café inoculados y sin inocular fueron descascarillados manualmente y tostados en una estufa (marca BINDER modelo FD 23 L) a 220 °C por 35 min, hasta un punto medio de tostado. El molido se realizó por un tiempo de 5 min en un molino eléctrico (marca Bosch). Fueron pesados 5.8 g de café en un matraz y 100 ml de agua destilada hervida a 96 °C fueron adicionados sobre el café. El recipiente fue tapado y agitado por 3 min. En seguida, la mezcla fue filtrada en un embudo de vidrio forrado con papel filtro cualitativo Whatman n° 1 y el filtrado fue recolectado en un matraz de 250 ml.

2.16. Análisis de COV por GC-MS

2.16.1. De la bebida

Fueron transferidos 5 ml de la bebida filtrada a un vial (20 ml) que contenía 0.4 g de cloruro de sodio que fue utilizado para promover la liberación de los compuestos volátiles de la fase líquida (bebida) en el espacio de cabeza (fase gaseosa). El vial se selló herméticamente con una tapa de aluminio y septa de PTFE / silicona. Con la ayuda de un vortex el vial fue agitado por 15 s (Thammarat et al., 2018). El vial fue colocado en un termobloque a 60 °C por 15 min para alcanzar el equilibrio entre la muestra y el espacio

de cabeza en el vial. La extracción de los COV fue mediante microextracción en fase sólida (SPME), utilizando la fibra de Divinilbenceno / Carboxen / Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) fue expuesta directamente al espacio de cabeza para la extracción de los volátiles por un tiempo de 30 min, a la misma temperatura de equilibrio (Budryn et al., 2011). Después de la adsorción, la fibra fue insertada directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo para la desorción térmica en el inyector a 250 °C en modo splitless por 10 min. La separación de los COV fue realizada en una columna capilar DB-624 UI (60 m × 0.25 mm diámetro interno × 1.4 μm espesor del film de relleno). Se utilizó el helio como gas de arrastre con un flujo de 1.0 ml/min. La programación del horno fue inicialmente de 35 °C por 5 min, subiendo 4 °C/min hasta 250 °C y fue mantenida a esta temperatura por 45 minutos. Las temperaturas de la fuente de ionización y del detector de masas (cuadrupolo) fue, respectivamente, de 280 °C y 150 °C. El espectrómetro de masas registró la corriente iónica total (70 eV) en un rango de masa (m/z) de 35 a 500 amu con modo scan de 1562 amu/s. Los análisis fueron realizados en triplicado.

2.16.2. De los microorganismos

Los microorganismos fueron sembrados en medio inclinado CYA colocado en los viales para headspace de 20 ml. El vial fue cerrado herméticamente e incubado a 25 °C por 10 días. También se utilizó la SPME. El vial fue colocado en un termobloque a 25 °C por 15 min y, utilizando la misma fibra mencionada anteriormente se extrajo 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 4 min. Se utilizó la columna capilar mencionada (DB-624 UI). La temperatura del horno empezó de 40 °C y subió a un rango de 5 °C/min hasta 240 °C. El gas de arrastre helio fue utilizado con un flujo de 1.0 ml/min. Los análisis fueron realizados en triplicado.

2.16.3. Identificación de los compuestos volátiles

Los compuestos volátiles fueron identificados por la comparación de los espectros de masa obtenidos 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.

2.17. Análisis de datos

Para el análisis estadístico de los resultados de humedad y pH de los granos verdes sometidos a los procesos de esterilización, se utilizó la prueba paramétrica del análisis de varianza (ANOVA), previa verificación y cumplimiento de las suposiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas de los residuos para cada una de las variables 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 llamados componentes principales o dimensiones, esta transformación se realizó con los COV originales de las bebidas preparadas con granos sin esterilizar, granos esterilizados sin inoculación, granos inoculados con *Aspergillus* no toxigénico y granos inoculados con *Aspergillus* toxigénico, 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, en que se consideró la suma de los porcentajes de variabilidad de las dos primeras dimensiones (porcentaje superior a 80%) por representar una información fiable de la explicación de la variabilidad de los datos. Además, los COV producidos por las especies fúngicas también fueron analizados por ACP. Asimismo, se realizó un agrupamiento de los COV de la bebida y de los hongos en grupos de seis y tres, respectivamente, utilizando el análisis de cluster jerárquico que también es una técnica del análisis multivariado basándose en la similitud entre sus observaciones. Todas las variables fueron estimadas por triplicado y los datos fueron analizados con el software estadístico R (R Development Core Team, 2020).

III. RESULTADOS

3.1. Esterilización granos de café

Tras ensayos preliminares de esterilización y con la finalidad de evitar la influencia de otros microorganismos ya presentes en los granos, y que podrían competir con los aislados inoculados, se optó por el mejor método de esterilización por calor húmedo (autoclavado) a 121 °C por 15 min (A15min). La eficiencia de todos los procesos de esterilización realizados se observa en la Figura 4A. Donde no se observó crecimiento de microorganismos en los granos que fueron sometidos a los diferentes tratamientos de esterilización, mientras que los granos que no fueron sometidos a ningún proceso de esterilización presentaron crecimiento fúngico (Figura 4B).

Figura 4

Siembra directa de granos de café almacenados en medio DG18, incubados a 25°C por 7 días, autoclavados a 121°C/15 min (A15min); autoclavado por a 121°C/1 h (A1h); esterilizado químicamente con óxido de propileno (EOP)); granos sin ningún tratamiento (GSNT)



3.2. Determinación de porcentaje de humedad de granos de café

Tras ensayos preliminares descritos en la Tabla 6 (anexos), el porcentaje de humedad de los granos de café con los que se trabajó se obtuvo promediando las repeticiones (R1, R2 y R3) del segundo ensayo realizado (Tabla 1).

Tabla 1*Porcentaje de humedad de granos de café*

	R1	R2	R3	Promedio humedad (%)
GSNT	21.25	20.70	21.30	21 ^a
A15min	18.62	18.12	18.01	18 ^b
EOP	23.22	21.87	20.43	22 ^a

Nota: granos sin ningún tratamiento (GSNT); autoclavado por 15 min (A15 min); esterilizado con oxido de propileno (EOP); repeticiones (R1, R2 y R3). Letras sobrescritas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.3. Determinación de pH de granos de café

Tras ensayos preliminares (Tablas 7 - Anexos), al final se obtuvo los datos de pH presentados en la Tabla 2.

Tabla 2

Granos sin ningún tratamiento (GSNT); autoclavado por 15 min (A15min); esterilización con oxido de propileno (OP)

	R1	R2	R3	Promedio pH
GSNT	6.20	6.18	6.24	6.21 ^a
A15min	6.21	6.10	6.19	6.17 ^a
EOP	6.28	6.38	6.22	6.29 ^a

Nota. Repeticiones (R1, R2 y R3). Letras sobrescritas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.4. Porcentaje de infección de granos de café

De la siembra directa de los granos de café almacenados, se observó 23 granos infectados a los 4 días de la siembra. Se realizó el cálculo del porcentaje de infección utilizando la ecuación 2, arrojando 58% de infección.

$$\% \text{ Infección} = \frac{N^{\circ} \text{ granos infectados}}{N^{\circ} \text{ granos evaluados}} \times 100 = \frac{23}{40} \times 100 = 58\%$$

3.5. Aislamiento de hongos a partir de los granos de café

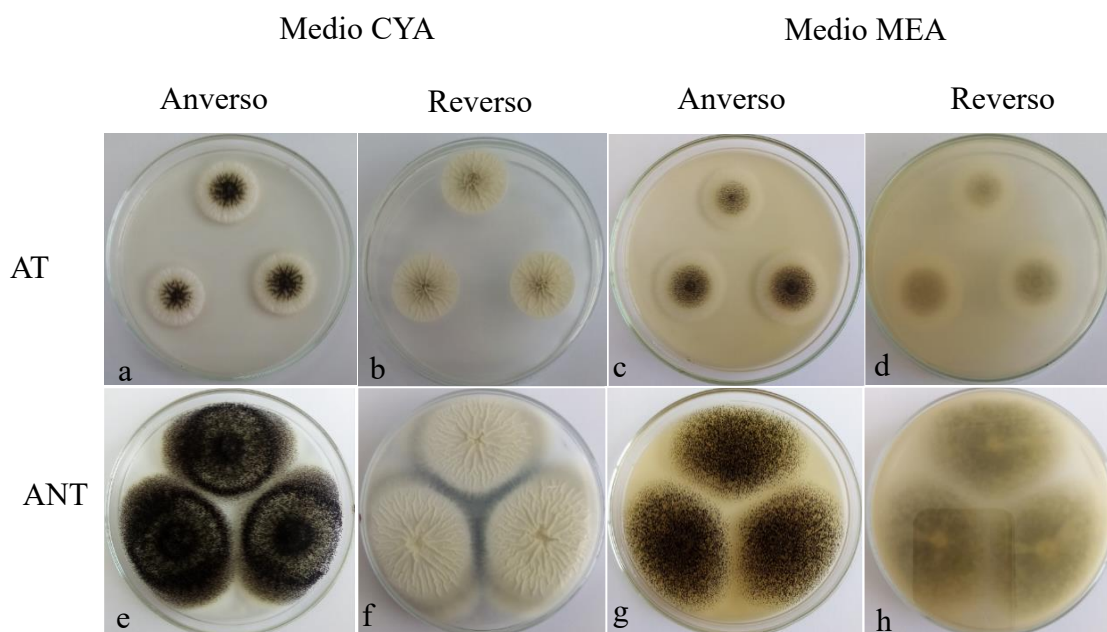
A partir de la siembra directa de los granos de café se realizó el aislamiento de las colonias fúngicas que crecieron en ellos. Todos los microorganismos aislados pueden ser observados en la Figura 25 (Anexos). A partir de estos resultados y de otras investigaciones, así como de las observaciones macro y micromorfológicas, fueron identificadas y seleccionadas las especies de *Aspergillus* toxigénico y no toxigénico.

3.6. Características macro y micro morfológicas de *Aspergillus* sp. toxigénico y *Aspergillus* sp. no toxigénico

En la Figura 5 se observan las colonias (características macromorfológicas) de los aislados de *Aspergillus* toxigénico y no toxigénico.

Figura 5

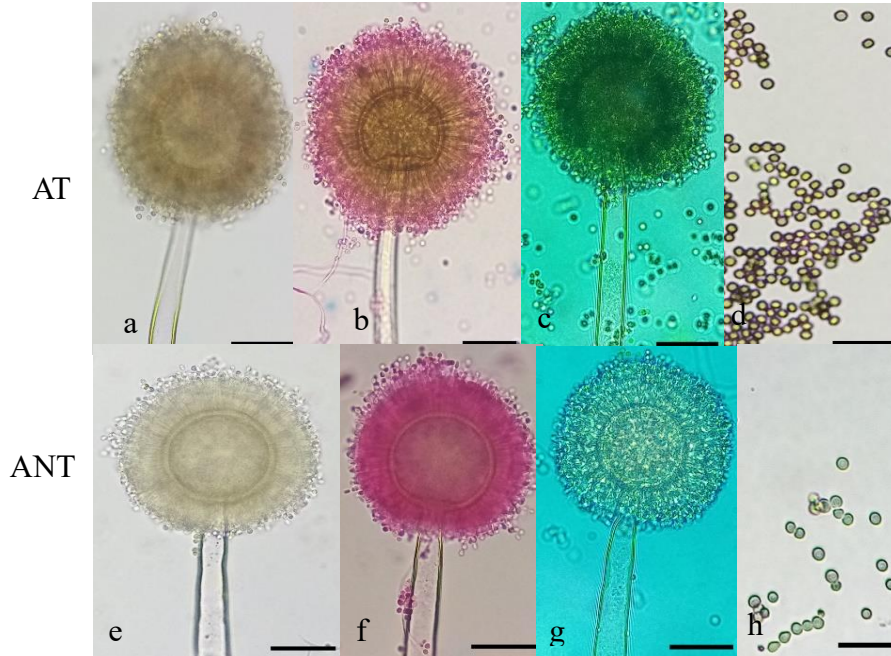
Aspergillus sp. toxigénico (AT); *Aspergillus* sp. no toxigénico (ANT); después de 7 días de incubación a 25 °C



En la Figura 6 están las estructuras microscópicas de los aislados del género *Aspergillus* utilizados en el presente trabajo.

Figura 6

Aspergillus sp. toxigénico (AT); *Aspergillus sp. no toxigénico (ANT)* después de 7 días de incubación a 25 °C; imágenes de cabezas conidiales con barras referencia de 40 µm (a, e) sin colorear, (b, f) coloreadas con fucsina ácida, (c, g) coloreadas con azul de lactofenol e imágenes (d, h) de los conidios sin colorear con barra referencia de 20 µm



La descripción de las características macro y microscópicas de los hongos se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Descripción macroscópica y microscópica de los aislados de Aspergillus sp. toxigénico (AT) y Aspergillus sp. no toxigénico (ANT)

Código	Características macroscópicas y microscópicas
AT	Colonias en CYA de 59.83 mm de diámetro, con micelio blanco subsuperficial, coronado por una capa de conidióforos cerca de los bordes, cabezas conidiales individuales visibles a simple vista, que cubren las áreas centrales de color negro azabache; reverso con un color crema pálido. Colonias en MEA de 60.47 mm de diámetro, similares a las de CYA, pero menos densas; micelio subsuperficial discreto; cabezas conidiales visibles sobre toda la colonia, negro azabache; reverso color crema pálido. Colonias en G25N de 27.47 mm de diámetro, de superficie blanca con micelio subsuperficial coronado por cabezas conidiales negras escasas; reverso sin color. Conidióforos nacidos de hifas superficiales o subterráneas, con

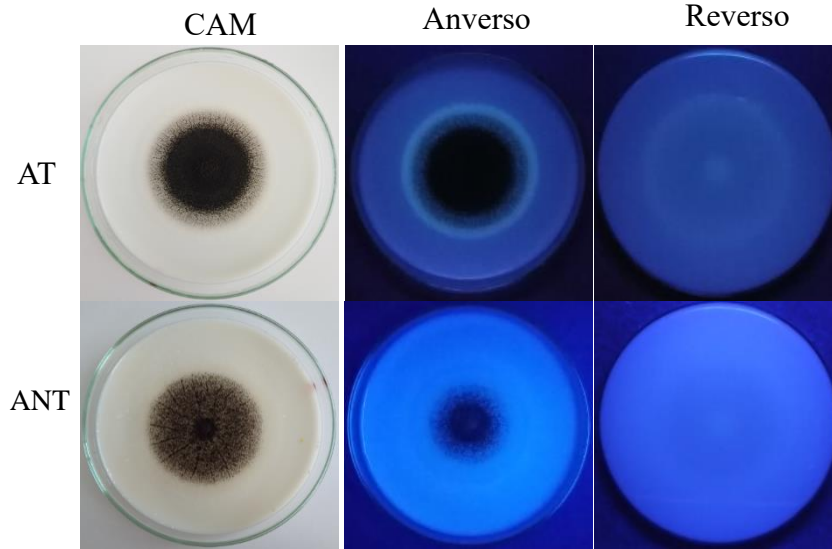
Código	Características macroscópicas y microscópicas
	paredes gruesas y lisas, incoloras de 17.6 μm de ancho, vesículas esféricas u achatadas de 51.18 μm de diámetro; fiálides muy juntas; conidios esféricos 3.43 μm de diámetro.
ANT	Colonias en CYA de 66.44 mm de diámetro, con micelio blanco subsuperficial, coronado por una capa de conidióforos cerca de los bordes, cabezas conidiales individuales visibles a simple vista, que cubren las áreas centrales de color negro azabache; reverso incoloro. Colonias en MEA de 66.00 mm de diámetro, similares a las de CYA, pero menos densas; micelio subsuperficial discreto; cabezas conidiales visibles sobre toda la colonia, negro azabache; reverso sin color. Colonias en G25N de 26.39 mm de diámetro, de superficie blanca con micelio subsuperficial coronado por cabezas conidiales negras escasas; reverso sin color. Conidióforos nacidos de hifas superficiales o subterráneas, con paredes gruesas y lisas, incoloras de 21.95 μm de ancho; vesículas esféricas u achatadas de 70.85 μm de diámetro; fiálides muy juntas; conidios esféricos.

3.7. Inoculación en medio CAM para la evaluación de la producción de extrolitos

La Figura 7 muestra la fluorescencia en el medio CAM presentada por el aislado toxigénico y la ausencia de esta en el aislado no toxigénico.

Figura 7

Aislados pertenecientes al género Aspergillus sección Nigri, siendo el Aspergillus sp. toxigénico que presenta fluorescencia (AT); Aspergillus sp toxigénico que presenta fluorescencia (AT); Aspergillus sp. no toxigénico que no presenta fluorescencia (ANT).



3.8. Cultivo puro a partir de punta de hifa

Inicialmente, una espora de cada aislado fue separada del medio sólido agar agua al 5% y colocada en otra placa con medio de cultivo PDA. Después del periodo de incubación y la visualización del crecimiento de la hifa se hizo el corte (Figura 8B), nuevamente, el material fue transferido a otra placa con medio CYA. La Figura 9 muestra las colonias de los aislados que fueron utilizadas para la preparación del inóculo.

Figura 8

Observación del crecimiento de las hifas en el esteroscopio (A); corte de la punta de hifa (B)

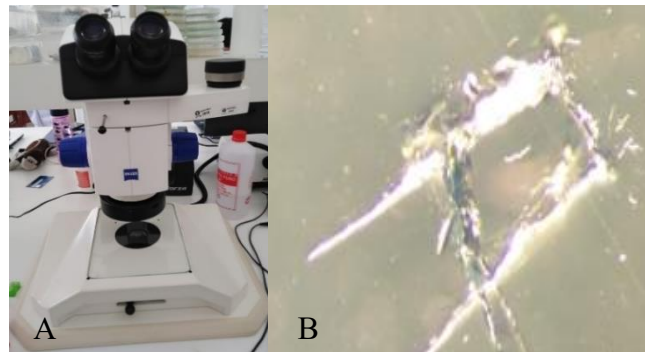
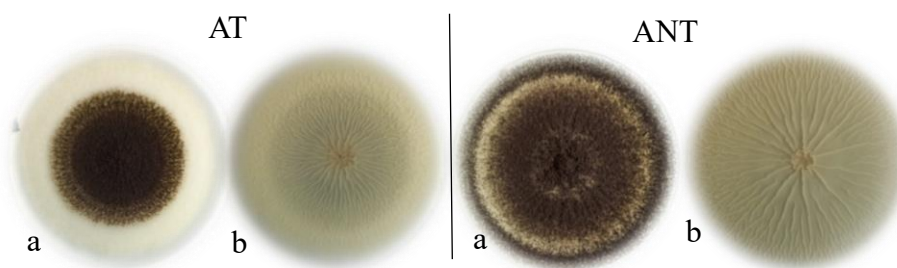


Figura 9

Aspergillus sp. toxigénico (AT) y *Aspergillus sp. no toxigénico (ANT)*; anverso (a); reverso (b); sembrados en medio CYA e incubados a 25°C por 10 días



3.9. Inoculación de *Aspergillus sp. toxigénico* y *Aspergillus sp. no toxigénico* en los granos de café

La realización de ensayos preliminares (Tabla 8 – Anexos) fueron determinantes para conocer un aproximado de esporas en cada dilución que se utilizaría como inóculo. En la Tabla 4 se muestra la concentración de esporas en las suspensiones preparadas para la inoculación de los granos de café esterilizados.

Tabla 4

Conteo de esporas de Aspergillus sp. toxigénico (AT) y Aspergillus sp. no toxigénico (ANT)

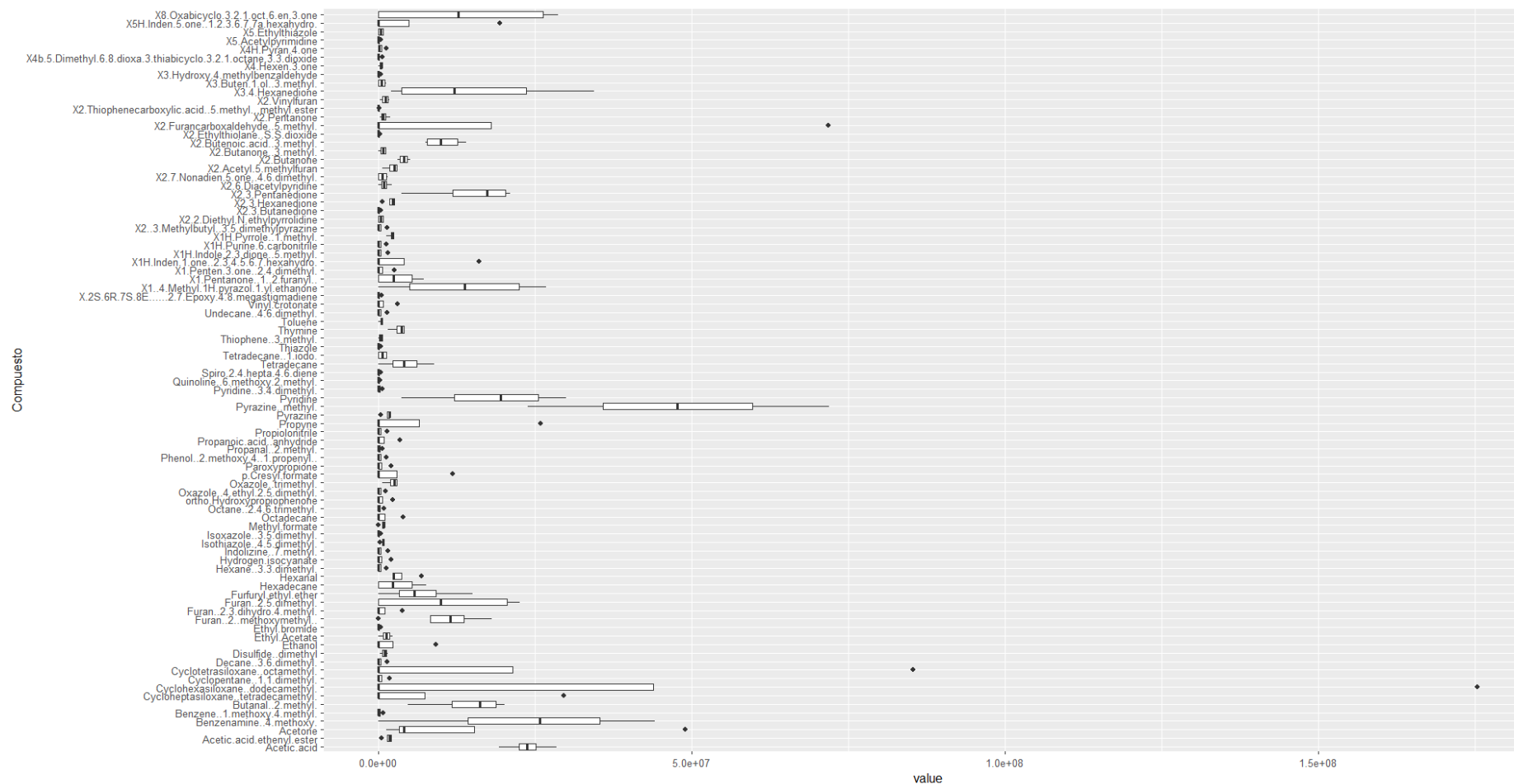
AT		ANT	
Dilución 10 ⁻²	Esporas / ml	Dilución 10 ⁻²	Esporas / ml
Repetición 1	5.9 × 10 ⁶	Repetición 1	6.1 × 10 ⁶
Repetición 2	5.2 × 10 ⁶	Repetición 2	7.1 × 10 ⁶
Promedio	5.6 × 10 ⁶	Promedio	6.6 × 10 ⁶

3.10. COV de la bebida

En la Figura 10 se observa el comportamiento variable en relación a cada COV, en el que podemos observar que los compuestos metil-pirazina y 4-metoxi-benzenamina presentan una mayor variabilidad frente a los demás, también mencionar la presencia de valores atípicos en los compuestos 5-metil-2-furancarboxaldehído, acetona, propino, 1,2,3,6,7,7a-hexahidro-5H-inden-5-ona, 2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-inden-1-ona, formiato de-cresilo y etanol motivo por el cual se estandarizó tales comportamientos y se trabajó con una matriz de correlaciones.

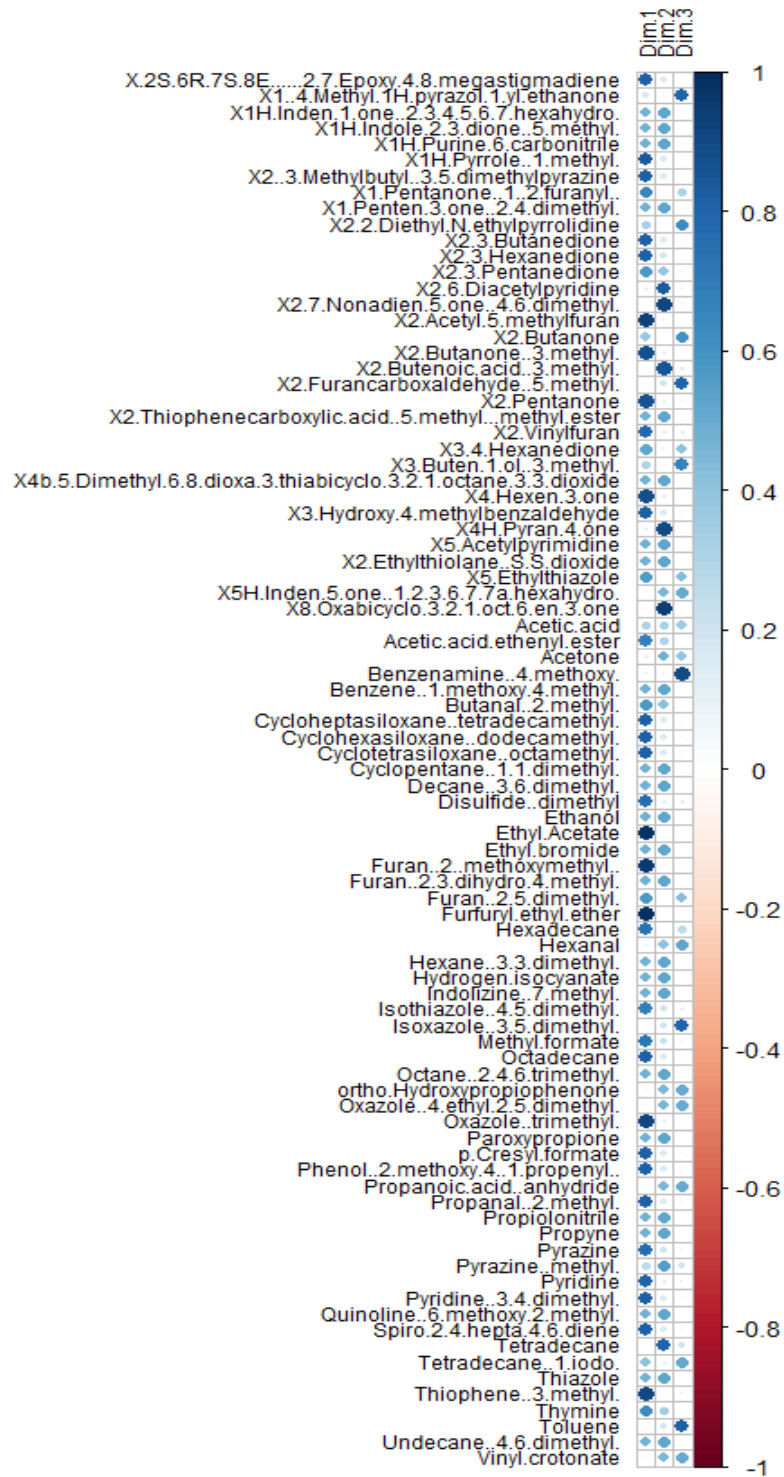
Figura 10

Diagrama de cajas por COV identificados en las bebidas de café



En la Figura 11, se aprecia la matriz de correlaciones de todos los COV de la bebida y su grado de asociación entre las tres dimensiones o componentes principales.

Figura 11
Grado de correlación de los COV de la bebida según dimensión



En la Tabla 5 están los valores propios o las varianzas de los componentes principales. La Figura 12 representa a la gráfica de la sedimentación con los resultados de los componentes principales, sin embargo, los dos primeros componentes principales (Componente 1 y 2) explican el 84% de la variación en los datos.

Tabla 5

Análisis de valores propios de la matriz de correlación para los COV de la bebida de café

	Valor propio	Porcentaje de variabilidad	Porcentaje de variabilidad acumulada
Componente 1	44.92515	51.63810	51.63810
Componente 2	28.16354	32.37189	84.00999
Componente 3	13.91131	15.99001	100.00000

Figura 12

Sedimentación de ACP de la bebida de café

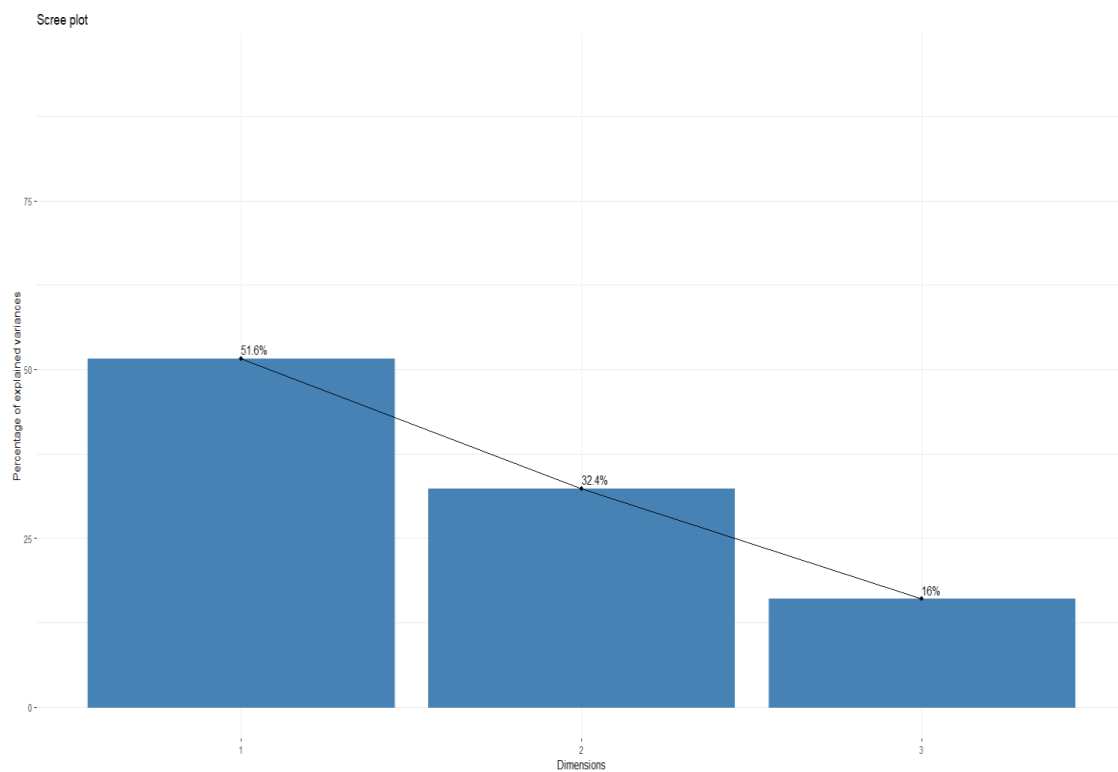
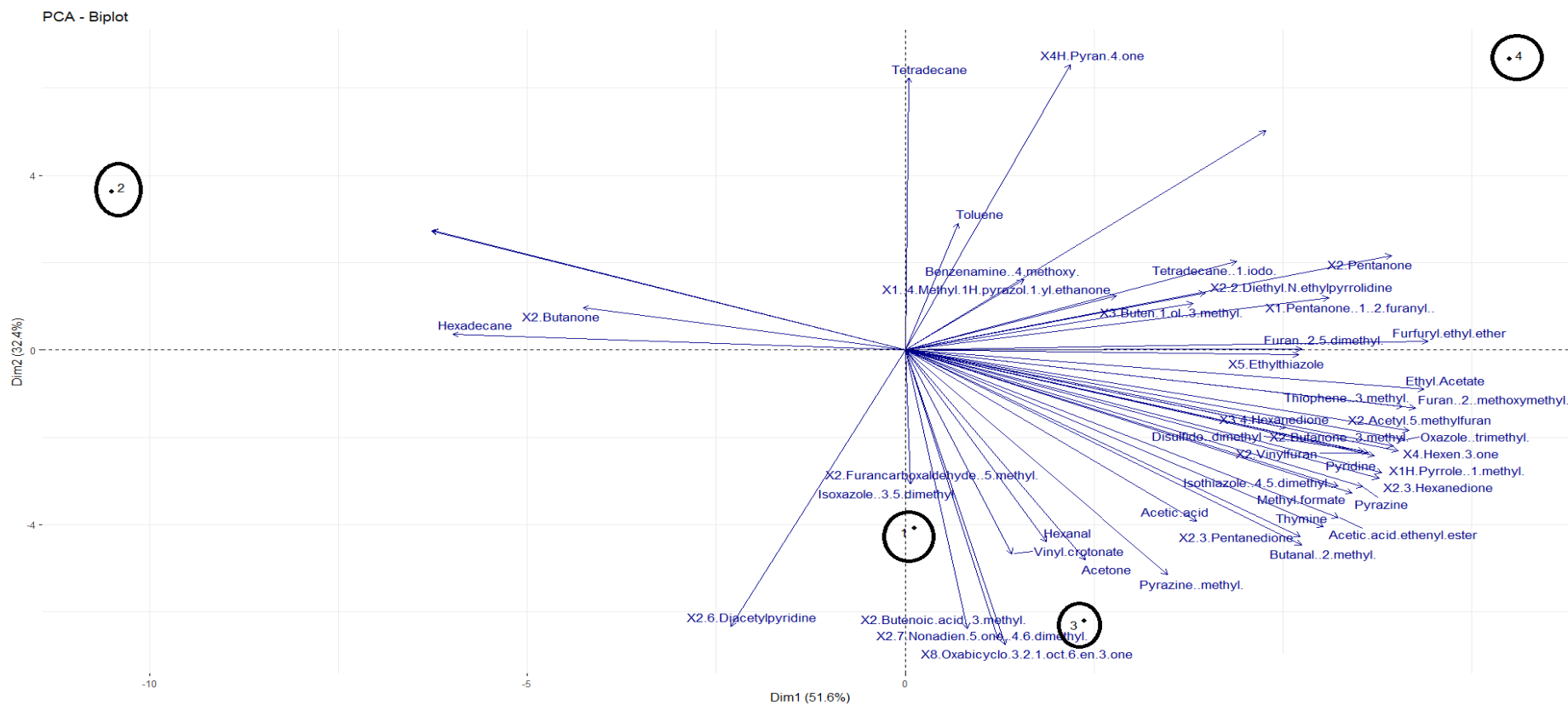


Figura 16

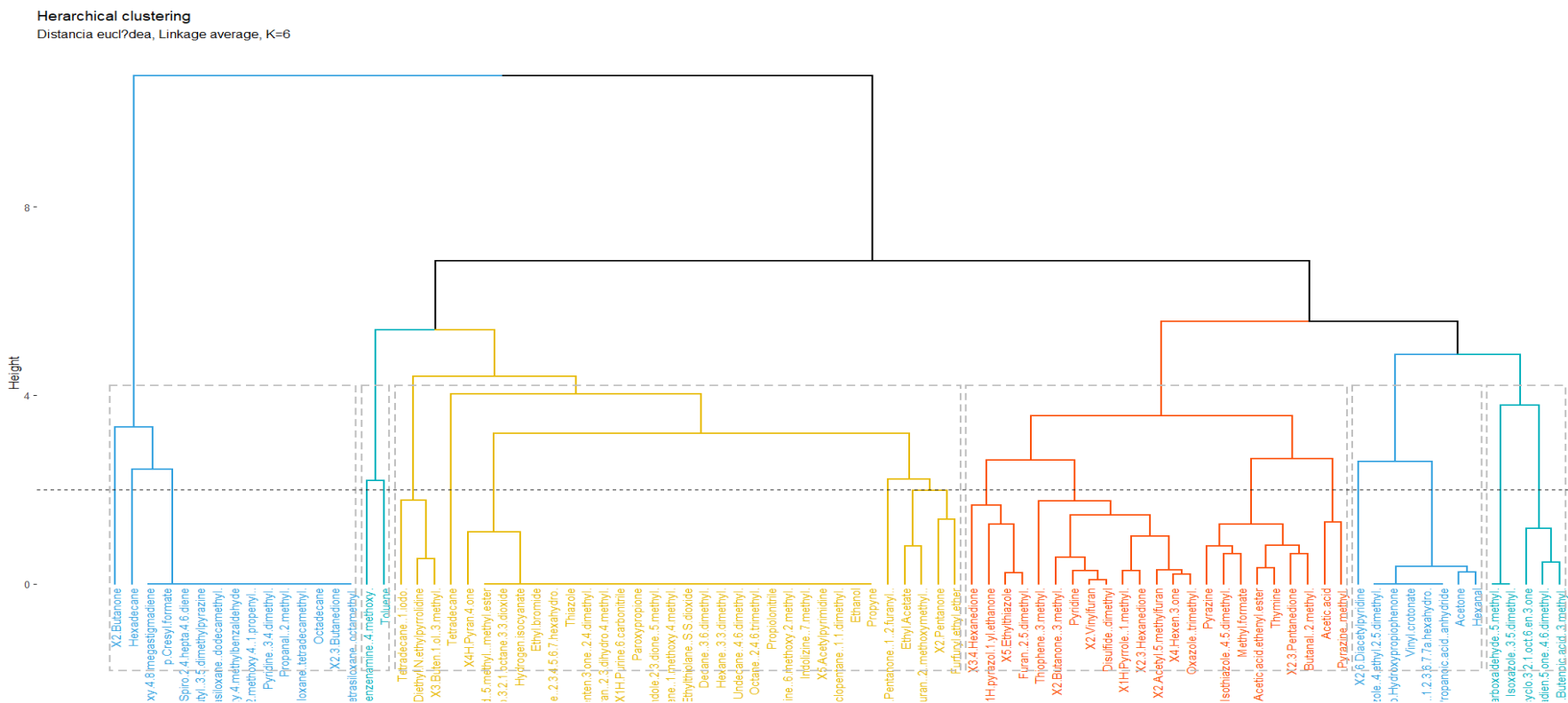
Doble proyección para COV y tratamientos (bebida de café)



Nota. Tratamiento 1: Bebida preparada con grano esterilizado; Tratamiento 2: Bebida preparada con grano sin esterilizar; Tratamiento 3: Bebida preparada con grano inoculado con *Aspergillus* toxigénico; Tratamiento 4: Bebida preparada con grano inoculado con *Aspergillus* no toxigénico.

La Figura 17 representa el dendrograma de agrupamientos de los COV de la bebida realizados con un enlace promedio y una distancia euclidiana, lo cual ocurre a un nivel de similitud de aproximadamente 6.0 y una correlación utilizado para el enlace promedio de 0.9295.

Figura 17
Dendrograma de los agrupamientos de los COV de la bebida de café



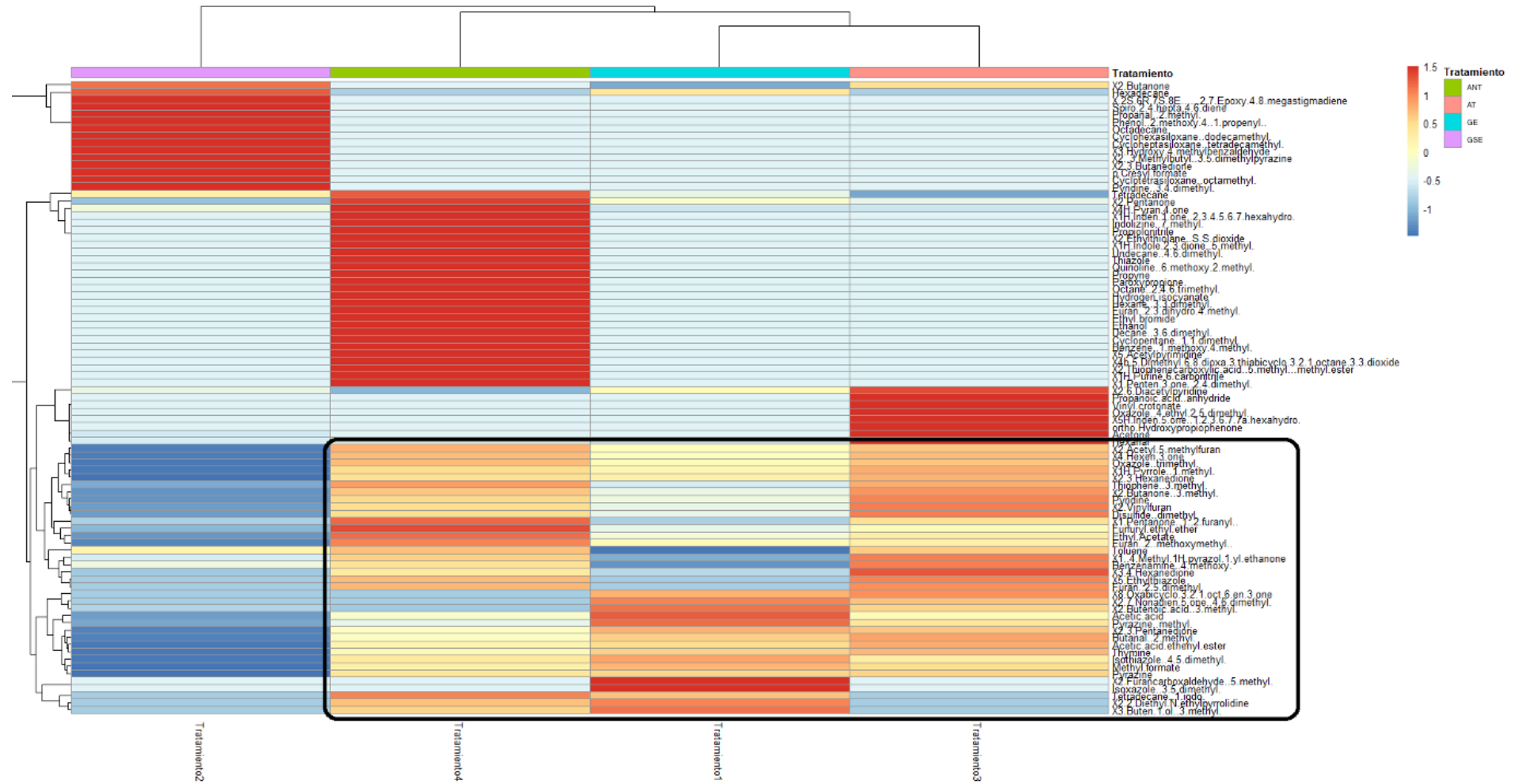
La Figura 18 representa el dendrograma de agrupamientos de los COV realizados con un enlace promedio y una distancia euclidiana, lo cual ocurre a un nivel de similitud de aproximadamente 6.0 y una correlación utilizado para el enlace promedio de 0.9295. Como en el ACP, observamos que el tratamiento 1 (GE) está agrupando los compuestos que más contribuyen como el furancarboxaldehído y 3,5-dimetil-isoxazol, mientras que el tratamiento 2 (GSE) se encuentra alrededor de los compuestos que más contribuyen como butanona y hexadecano. El tratamiento 3 (AT) se encuentra agrupando a los compuestos volátiles diacetilpiridina, ácido propanoico anhidro, entre otros y, el tratamiento 4 (ANT), los compuestos pentanona, tetradecano, etc. También se observa en la Figura 18 seis agrupaciones de COV en los 4 tratamientos con las siguientes cifras:

- Un primer cluster conformado por 15 COV y con una contribución alta entre 1.0 y 1.5 (color rojo) en el tratamiento GSE;
- Un segundo cluster conformado por 23 COV y con una contribución que varía entre 0 y 1.0 en el tratamiento AT;
- Un tercer conglomerado conformado por 34 COV y con una contribución que varía entre -0.5 y 1.5 en el tratamiento ANT;
- Un cuarto conglomerado conformado por 8 COV y con una contribución que varía entre 1.0 y 1.5 en el tratamiento AT;
- Un quinto cluster conformado por 5 COV y con una contribución que varía entre 1.0 y 1.5 en el tratamiento GE;
- Y, el sexto grupo conformado por 2 COV y con una contribución próximo de 1.0 en el tratamiento AT.

En la Figura 19 se muestra la presencia y contribución de los COV que se encuentran en tres (ANT, GE y AT) de los 4 tratamientos de la bebida del café los cuales varían en un rango de 0 y 1.0. Siendo que los granos de café de los tratamientos mencionados coinciden haber pasado por el tratamiento térmico de esterilización por calor húmedo.

Figura 19

Dendrograma de COV según agrupamiento por tratamientos evidenciando un patrón de COV en los tratamientos resaltados

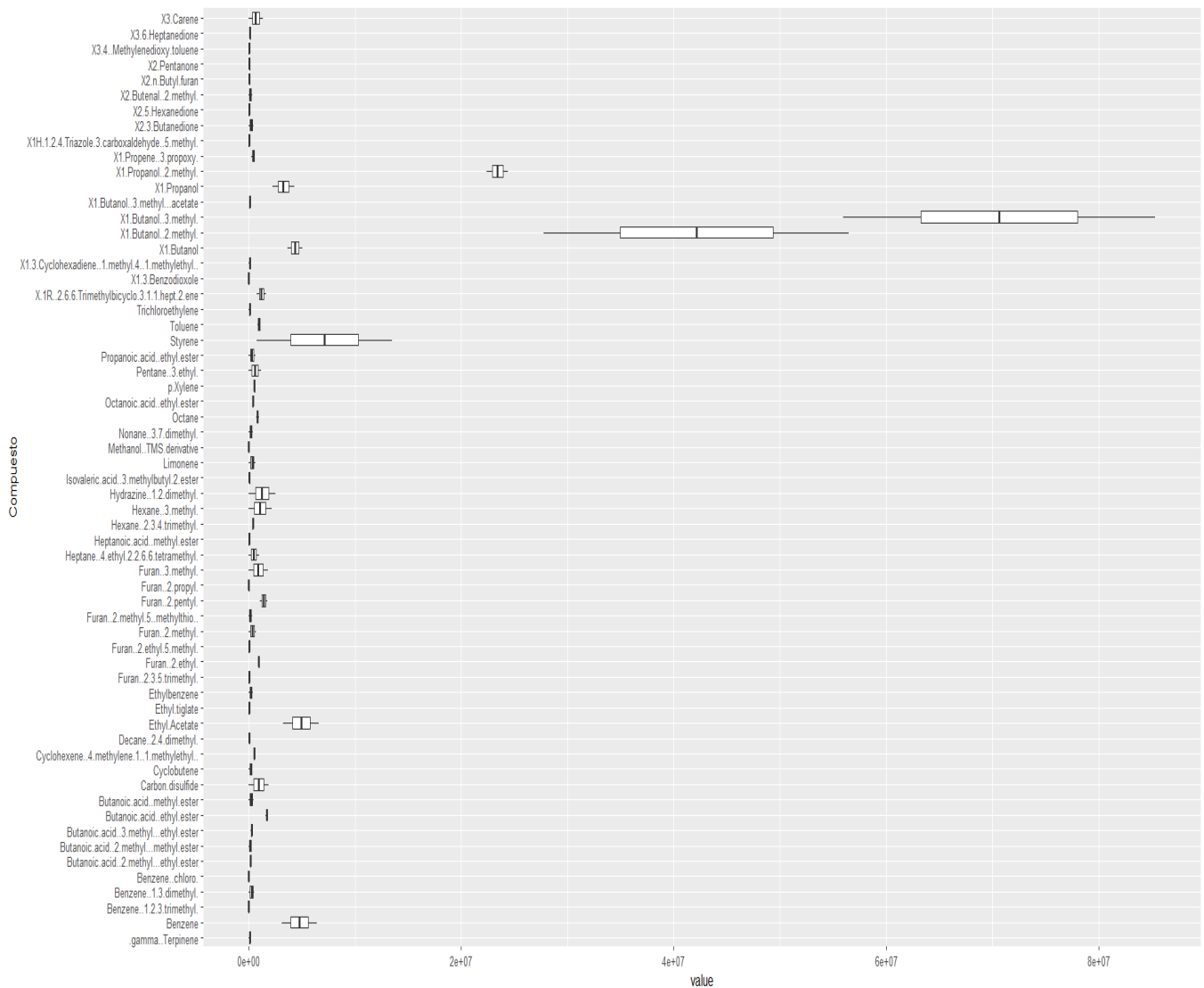


3.11. COV de los microorganismos

En la Figura 20 se puede observar el comportamiento variable en relación a cada compuesto volátil, en el que podemos observar que los compuestos 2-metil-1-propanol; 3-metil-butanol; 2-metil-butanol y estireno presentan una mayor variabilidad y valores más altos en sus áreas frente a los demás. En este caso, no existen evidencias de la presencia de valores atípicos. Por la mayor variabilidad de los compuestos antes mencionados se trabajó con una matriz de correlaciones.

Figura 20

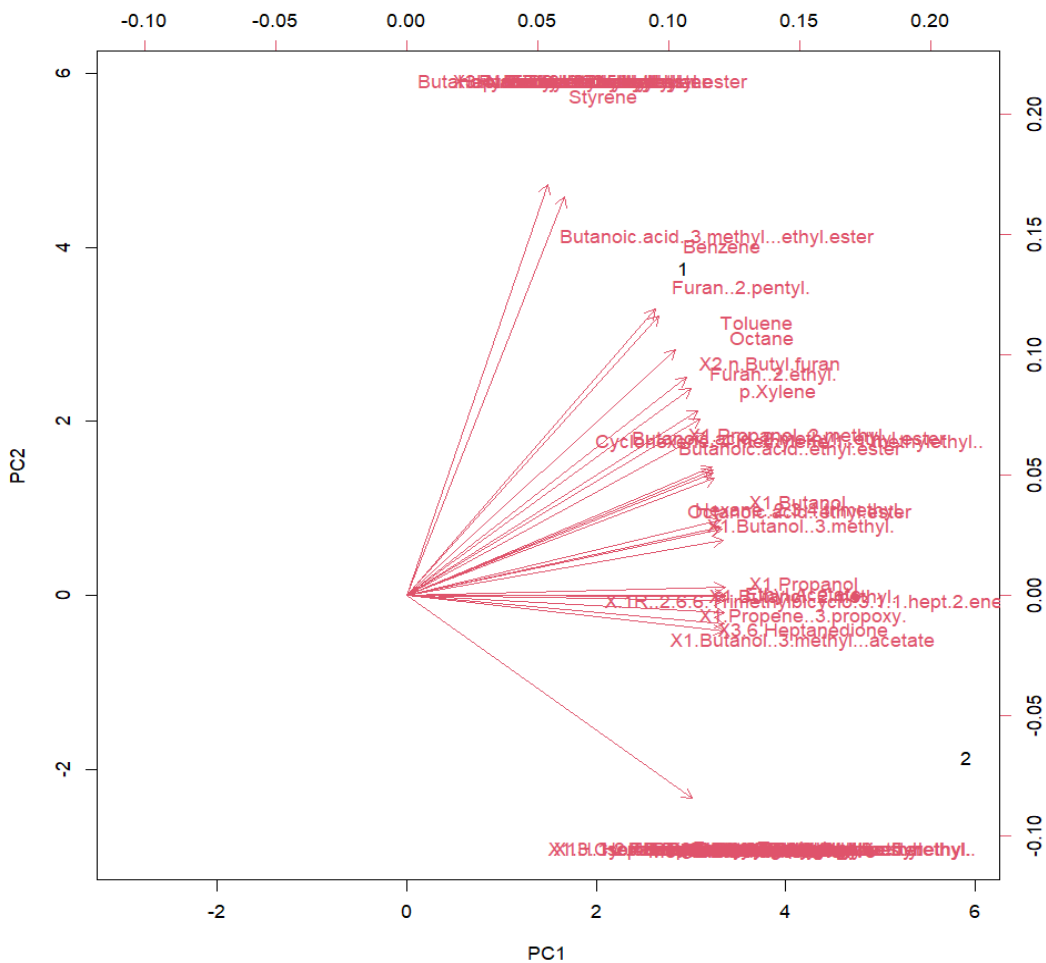
Diagrama de cajas por COV de los microorganismos estudiados



La Figura 21 muestra el gráfico de doble proyección (biplot) de los COV y tratamientos (microorganismos) presentes en los dos componentes principales. La primera componente explica la variabilidad de 71.12% de los datos, mientras que la componente dos, explica el 28.88% de la variabilidad total. Siendo así, las dos componentes explican el 100% de la variación de los datos mostrando evidencias significativas en las relaciones entre los compuestos y los tratamientos y, claramente se aprecia agrupamientos tanto de los compuestos sobre los tratamientos: 1 (*Aspergillus* toxigénico o AT) y 2 (*Aspergillus* no toxigénico o ANT). Así el tratamiento 1 está alrededor de los compuestos que más contribuyen como el 2-etil-furan, 2n-butil-furan, p.xileno, entre otros, mientras que el tratamiento 2 se encuentra alrededor de los compuestos acetato de 3-metil-1-butanol, 3,6 heptanediona, 1-propanol, etc. que más contribuyen en los volátiles de este último tratamiento.

Figura 21

Doble proyección para COV y tratamientos (microorganismos)



Las Figuras 22 y 23 representan el dendrograma de agrupamientos de los COV realizados con un enlace promedio y una distancia euclidiana, lo cual ocurre a un nivel de similitud de aproximadamente $2e+14$ y una correlación utilizada para el enlace promedio de 0.9954. También muestra evidencias estadísticas como la que se presentan en la Figura 23, agrupaciones de compuestos volátiles en los 2 tratamientos con las siguientes cifras:

- Un primer cluster conformado por 21 COV como, por ejemplo, 2-n-butil-furan, éster etílico del ácido 3-metil-butanoico; p.xileno; 3-etil-pentano; 1,2-dimetil-hidrazina, etc. y con una contribución alta que varía entre 0.6 y 1.0 (color rojo) en el tratamiento AT;
- Un segundo cluster conformado por 39 COV considerando al acetato de 3-metil-1-butanol; 3,6-heptanediona; 1-propanol, etc. y con una contribución que también varía entre 0.6 y 1.0 en el tratamiento ANT;
- Un tercer conglomerado conformado por un único COV que es el estireno con una contribución en el tratamiento AT próximo a 1.0.

Figura 22

Dendrograma circular de los COV de los microorganismos

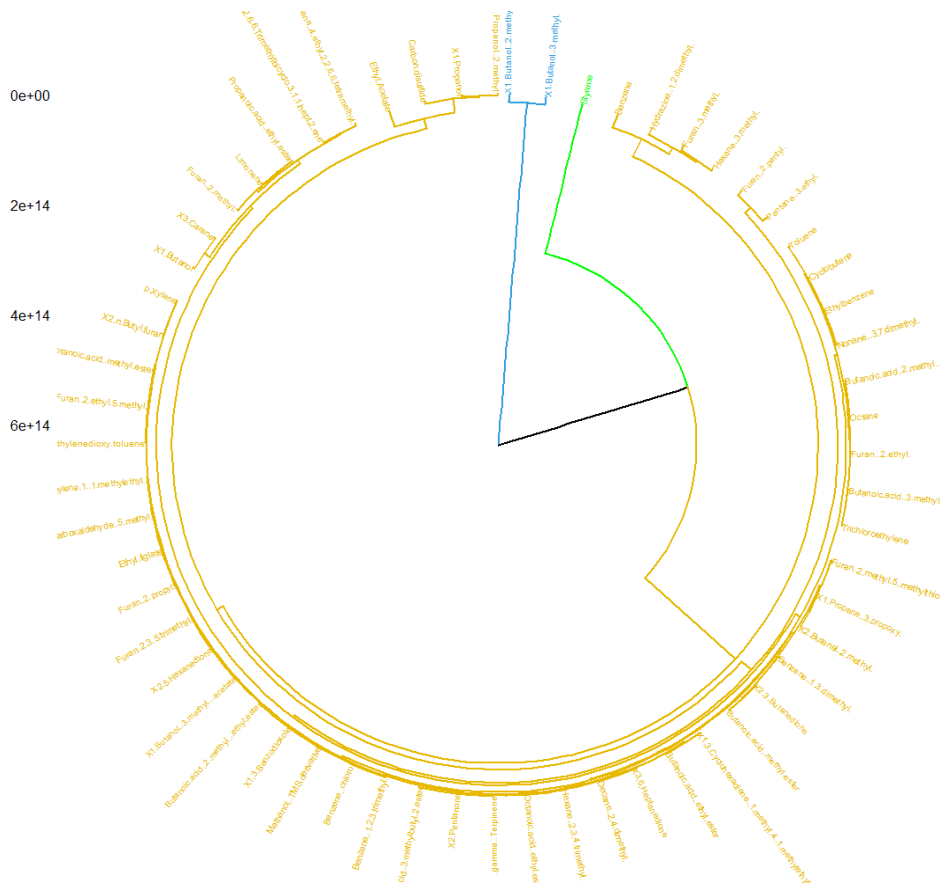
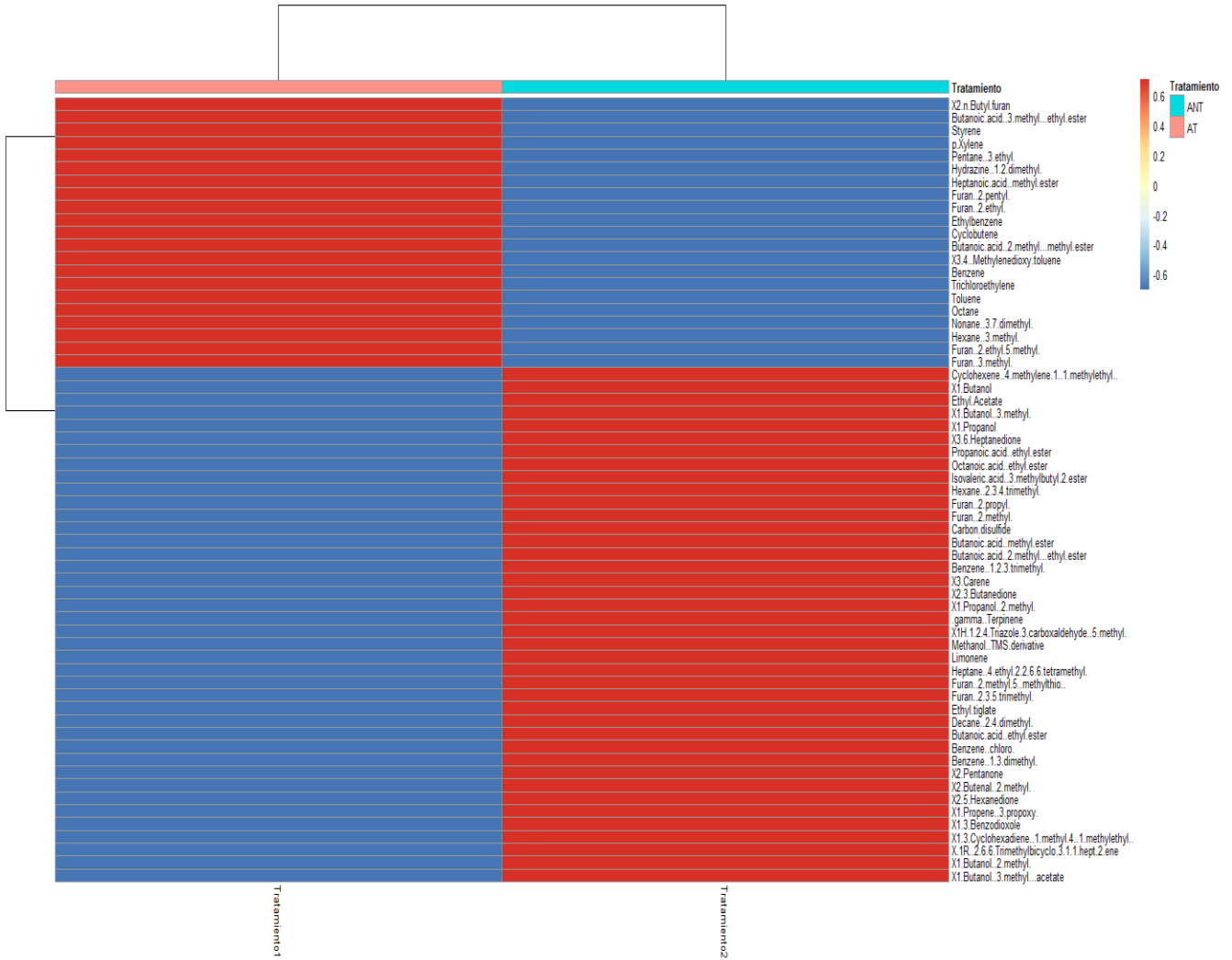


Figura 23

Dendrograma de los COV agrupados según tratamientos (microorganismos)



IV. DISCUSIÓN

La calidad de la bebida de café está fuertemente relacionada a las características fisicoquímicas del grano como el pH y la humedad y, a su vez, estas pueden ser afectadas por los procesos postcosecha (Varnam & Sutherland, 1994). En una comparación entre granos clasificados y defectuosos de café arábica, el pH varió de 5.74 a 6.42, no habiendo diferencia significativa entre ellos. Sin embargo, los menores valores de pH fueron encontrados en el café defectuoso (Ramalakshmi et al., 2007). El pH encontrado en los granos sin autoclavar, autoclavados y esterilizados químicamente (GSNT, A15min y EOP) del presente trabajo estuvo entre 6.21 y 6.29, estando dentro del rango reportado en la literatura (Mazzafera, 1999; Ramalakshmi et al., 2007). Los valores de humedad del presente trabajo variaron de 18 a 22%, siendo notablemente mayor al 12%, que es lo adecuado (Clarke & Macrae, 1985; Mazzafera, 1999; Ramalakshmi et al., 2007). No obstante, la diferencia de humedad, que no debe llegar a más de 40% (Mantle & Chow, 2000), no afectó el desarrollo de los microorganismos inoculados, como se puede observar en la Figura 27 (anexos).

Los hongos fitopatógenos causan graves daños y disminuyen la calidad de los productos agrícolas. Ellos destruyen frutas, verduras, hortalizas y granos antes y después de la cosecha (Spadaro & Gullino, 2004). Además, algunos de estos microorganismos pueden ser productores de micotoxinas, que son metabolitos secundarios con funciones no completamente entendidas y de difícil degradación bajo condiciones normales de procesamiento (Pitt & Hocking, 2022). La contaminación por micotoxinas en alimentos es inevitable y es un problema en todo el mundo (Wu et al., 2017).

La presencia de hongos en alimentos, principalmente en granos, es detectada generalmente por análisis sensorial (olfato). Este método es rápido y sensible, sin embargo, es subjetivo y, entre otros factores, puede ser afectado por el cansancio del panelista, además de ofrecer un riesgo a la salud por la exposición a ciertos volátiles tóxicos (Dickinson et al., 1998) y a las esporas fúngicas (Rylander, 1986). En este sentido, los métodos analíticos, como la cromatografía acoplada a detector de masas, son de gran importancia. Las investigaciones científicas que exploran el aroma y la composición volátil del café han comenzado a ser realizada hace más de 90 años y se han llegado a identificar más de 1000 COV (Lee & Shibamoto, 2002; Sanz et al., 2002). La propuesta inicial de la presente investigación fue evaluar los volátiles de la bebida y de los hongos utilizando solamente el HS-GC-MS. La microextracción en fase sólida proporciona un

rendimiento de extracción y recuperación más satisfactorio (Bressanello et al., 2017). Asimismo, la herramienta quimiométrica de ACP puede ser utilizada para determinar grupos o correlaciones de los compuestos químicos identificados con la calidad de la bebida, como es el caso de los COV, que son datos multivariados complejos (Alcantara et al., 2021; Caballero et al., 2021). No solamente la presencia o ausencia de algunos compuestos es importante, también lo es la concentración y el límite de percepción, que influyen en el efecto sinérgico o antagónico al momento del análisis sensorial (Bressanello et al., 2017).

Los compuestos furfural y 5-metil-2-furancarboxaldehído fueron reportados como aparentes marcadores de la calidad general de la bebida de café (Ribeiro et al., 2012). El 5-metil-2-furancarboxaldehído fue encontrado en el presente trabajo en la bebida preparada con GE. Este compuesto podría ser un indicador de la calidad y de la presencia de microorganismos ya que no tiene mucha contribución en el perfil de VOC de la bebida preparada con los granos esterilizados e inoculados.

Los compuestos 2,3-pentanodiona y 1-metil-1H-pirrol fueron reportados por conferir potentes olores de café tostado (Czerny & Grosch, 2000; Semmelroch & Grosch, 1996). En las figuras 18 y 19, se puede observar que el primer compuesto presenta una contribución moderada en las bebidas preparadas con GE y AT, mientras que el segundo compuesto tuvo una contribución baja en la bebida preparada con GE y ANT y una contribución moderada con AT.

El compuesto piridina fue reportado en investigaciones (Chavez et al., 2022; Ribeiro et al., 2012) como un indicador de la baja calidad del café. Este compuesto tuvo menor contribución en las bebidas preparadas con los granos esterilizados, siendo mayor en aquellas preparadas con los granos inoculados (ANT y AT). No obstante, Akiyama et al. (2005) encontraron resultados altos de área obtenidos por GC-MS para el compuesto mencionado y que no fueron detectados por cromatografía de gases acoplada a la olfatometría (GC/O), indicando la importancia de determinar los *threshold* (del inglés límites o umbrales) en que cada compuesto es percibido sensorialmente.

Algunos compuestos (2-metilbutanal, 2,3-hexanodiona, 2-(metoximetil)-furano) importantes para conferir la acidez de la bebida (Ribeiro et al., 2012) presentaron contribución moderada en la bebida preparada con GE, AT y ANT.

Las clases de COV como pirazinas y furanos son las que más contribuyen para el aroma del café. Estas dos clases de compuestos están más relacionadas a productos sometidos a tratamientos térmicos (tostado), no siendo tan comunes en las muestras de café verde. Los COV (pirazinas en café verde: 2,3,5,6-tetrametilpirazina y en café tostado: 3,5-dimetil-2-butilpirazina y furanos en grano verde y tostado: 2-pentil furano) de ambas clases reportados como marcadores de granos defectuosos (Toci y Farah, 2014) no fueron encontrados en el presente trabajo. Otros compuestos también fueron descritos por Toci y Farah (2014) como marcadores de defecto en granos de café verde (ácido hexanoico; 3-octen-2-ona; 2-octenal; butirolactona y 3-etil-2-metil-1,3-hexadieno) y café tostado (ácido hexanoico y 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol o β -linalool), pero no fueron encontrados en las muestras analizadas de nuestra investigación.

Caporaso et al. (2018) reportaron algunos COV (ácido acético y 2-metilpirazina) como los más abundantes en las muestras de café evaluadas, siendo que el ácido acético estaba en mayor concentración en el café arábica que en el robusta. Estos compuestos estuvieron presentes en las muestras analizadas en esta investigación, también entre los más abundantes. Ambos tuvieron una contribución positiva moderada en la bebida preparada con GE y una contribución negativa moderada en la bebida preparada con GSE. Con relación a la abundancia de ellos de la bebida preparada, se encontró en orden decreciente que $GE > AT > ANT > GSE$.

De acuerdo con Frost et al. (2022), el tolueno es el único compuesto con mayor concentración en el grano verde comparado al grano tostado. El tratamiento térmico (autoclavado) puede ser la explicación para la presencia de este compuesto solamente en la bebida preparada con GSE. Los autores también comentan que el linalool podría ser un marcador de la alta calidad general del café. Sin embargo, este COV no fue detectado en ninguna de las muestras evaluadas.

El café es una matriz compleja y para la formación de su aroma puede haber la participación de miles de compuestos (Toci & Farah, 2008; Yeretizian et al., 2003). Sin embargo, el aroma deseable de café es producido por un sutil equilibrio entre algunos de los volátiles detectados, donde se cree que solamente 5% de estos volátiles son los responsables por su aroma (Yeretizian et al., 2003). Siendo así, el estudio y la identificación de los COV sigue siendo importante para identificar cuáles son los compuestos que hacen parte de los 5% mencionados, asimismo, definir el equilibrio

adecuado para un café de alta calidad y mayor aceptación, además del efecto que los microorganismos presentes en los granos pueden tener sobre esas características.

Con relación a los volátiles emitidos por los hongos (AT y ANT) utilizados en la presente investigación, fueron detectados 61 compuestos orgánicos volátiles producidos por estos microorganismos (COVm), siendo 8 de ellos emitidos solamente por el AT y seis por el ANT. Tenemos como ejemplos de compuestos orgánicos volátiles producidos por microorganismos, el responsable por conferir el olor de tierra cuando llueve, o de alimentos que están en proceso de deterioro o de ambientes enmohecidos. Sin embargo, la exposición a algunos de estos volátiles, como tolueno, benceno, xileno, entre otros, son perjudiciales a la salud humana cuando somos expuestos a altas concentraciones de ellos (Bennett et al., 2012; Plog & Quinlan, 2002). Estos compuestos citados fueron encontrados en ambos aislados, solamente en el AT y en el ANT, respectivamente.

Los alcoholes 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol y 1-propanol estuvieron presentes en ambos (AT y ANT), siendo los tres primeros COVm los más abundantes. Sin embargo, el ANT produjo mayores concentraciones de los alcoholes mencionados discordando de Josselin et al. (2021) que encontraron valores semejantes para cada cepa de *Aspergillus flavus* (toxigénica y no toxigénica) evaluada en diferentes tiempos de incubación. Estos investigadores también encontraron otros compuestos en ambas cepas que coinciden con el presente trabajo, como el acetato de etilo y el éster etílico 2-metil del ácido butanoico (2-metilbutirato de etilo).

Los hongos producen volátiles, así como todos los demás organismos, pudiendo servir como una huella digital. Sin embargo, esta característica puede cambiar según la matriz (alimento, medio de cultivo, etc.) en que se encuentra (Cabañes et al., 2009). Asimismo, otros autores ya reportaron diferencias en la emisión de volátiles por aislados toxigénicos y no toxigénicos de la misma especie (Jelén & Grabarkiewicz-Szczęśna, 2005; Keshri & Magan, 2000).

V. CONCLUSIONES

Se encontró un total de 87 COV en la bebida de café de la variedad Catimor, bajo las condiciones del presente estudio.

El perfil de COV de la bebida de café obtenida de granos expuestos a *Aspergillus spp.* toxigénico y no toxigénico mostró diferencias, de forma que, los compuestos que contribuyen en la variabilidad de cada uno de ellos son particulares. El proceso de esterilización por calor húmedo, necesario para estimar la influencia de estos hongos, también influyó en el tipo de COV que contribuye.

Aunque en el presente estudio no se ha determinado los COV que podrían ser utilizados como marcadores químicos de la presencia de *Aspergillus spp.* y/o de la capacidad toxigénica de la especie utilizada, parece haber potencial para su utilización práctica.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyama, M., Murakami, K., Ikeda, M., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Wada, A., Tokuno, K., Onishi, M., Iwabuchi, H., & Tanaka, K. (2005). Characterization of flavor compounds released during grinding of roasted robusta coffee beans. *Food Science and Technology Research*, *11*(3), 298–307. <https://doi.org/10.3136/fstr.11.298>
- Alamri, E., Rozan, M., & Bayomy, H. (2022). A study of chemical Composition, Antioxidants, and volatile compounds in roasted Arabic coffee: Chemical Composition, Antioxidants and volatile compounds in Roasted Arabic Coffee. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *29*(5), 3133–3139. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.03.025>
- Alcantara, G. M. R. N., Dresch, D., & Melchert, W. R. (2021). Use of non-volatile compounds for the classification of specialty and traditional Brazilian coffees using principal component analysis. *Food Chemistry*, *360*(December 2020), 130088. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130088>
- Alfenas, A. C., & Mafia, R. G. (2007). *Métodos em fitopatologia*. (Segunda Ed). Editora UFV.
- 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>
- Bennett, J. W., Hung, R., Lee, S., & Padhi, S. (2012). 18 Fungal and Bacterial Volatile Organic Compounds: An Overview and Their Role as Ecological Signaling Agents. In *Fungal Associations* (Vol. 9, pp. 373–393). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30826-0_18
- Bressanello, D., Liberto, E., Cordero, C., Rubiolo, P., Pellegrino, G., Ruosi, M. R., & Bicchi, C. (2017). Coffee aroma: Chemometric comparison of the chemical information provided by three different samplings combined with GC–MS to describe the sensory properties in cup. *Food Chemistry*, *214*, 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.088>
- 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.

- Caballero, D., Ríos-Reina, R., & Amigo, J. M. (2021). Chemometrics and Food Traceability. In *Comprehensive Foodomics* (Vol. 3, pp. 387–406). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22859-X>
- Cabañes, F. J., Sahgal, N., Bragulat, M. R., & Magan, N. (2009). Early discrimination of fungal species responsible of ochratoxin A contamination of wine and other grape products using an electronic nose. *Mycotoxin Research*, 25(4), 187–192. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0027-x>
- 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(March), 628–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.077>
- Chauhan, R., Hooda, M. S., & Tanga, A. A. (2015). Coffee : The Backbone of Ethiopian Economy. *International Journal of Economic Plants*, 1(2), 082–086.
- Chavez, S. G., Mendoza, M. M., & Caetano, A. C. (2022). Antioxidants, phenols, caffeine content and volatile compounds in coffee beverages obtained by different methods. *Food Science and Technology (Brazil)*, 42, 1–8. <https://doi.org/10.1590/fst.47022>
- Chiaradia, M. C., Collins, C. H., & Jardim, I. C. S. F. (2008). O estado da arte da cromatografia associada ?? espectrometria de massas acoplada ?? espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quimica Nova*, 31(3), 623–636. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030>
- Chiotta, M. L., Fumero, M. V., Cendoya, E., Palazzini, J. M., Alaniz-Zanon, M. S., Ramirez, M. L., & Chulze, S. N. (2020). Toxigenic fungal species and natural occurrence of mycotoxins in crops harvested in Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*, 52(4), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.06.002>
- Clarke, R. J., & Macrae, R. (Eds.). (1985). *Coffee. Volume 1: Chemistry* (First Edit, Vol. 1). Elsevier Applied Science. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-4948-5>
- Costa Freitas, A. ., & Mosca, A. . (1999). Coffee geographic origin — an aid to coffee differentiation. *Food Research International*, 32(8), 565–573. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00132-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00132-5)
- Czerny, M., & Grosch, W. (2000). Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 868–872. <https://doi.org/10.1021/jf990609n>

- Dickinson, T. A., White, J., Kauer, J. S., & Walt, D. R. (1998). *Current trends in 'artificial-nose' technology*. *16*(June), 250–258.
- Ferrão, L. F., Caixeta, E., Pena, G., Zambolim, E., Cruz, C., Zambolim, L., Ferrão, M. A., & Sakiyama, N. (2015). New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. *Molecular Breeding*, *35*(1). <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0247-z>
- Frost, S. C., Walker, P., Orians, C. M., & Robbat, A. (2022). The Chemistry of Green and Roasted Coffee by Selectable 1D/2D Gas Chromatography Mass Spectrometry with Spectral Deconvolution. *Molecules*, *27*(16), 5328. <https://doi.org/10.3390/molecules27165328>
- Goff, S. A., & Klee, H. J. (2006). Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value? *Science*, *311*(5762), 815–819. <https://doi.org/10.1126/science.1112614>
- 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>
- Jelén, H. H., & Grabarkiewicz-Szczęśna, J. (2005). Volatile compounds of *Aspergillus* strains with different abilities to produce ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1678–1683. <https://doi.org/10.1021/jf0487396>
- Jeleń, H., & Wąsowicz, E. (2009). Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. *Food Reviews International*, *14*(4), 391–426. <https://doi.org/10.1080/87559129809541170>
- Josselin, L., De Clerck, C., De Boevre, M., Moretti, A., Haïssam Jijakli, M., Soyeurt, H., & Fauconnier, M. L. (2021). Volatile organic compounds emitted by *Aspergillus flavus* strains producing or not aflatoxin B1. *Toxins*, *13*(10). <https://doi.org/10.3390/toxins13100705>
- Keshri, G., & Magan, N. (2000). Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. using volatile mycotoxigenic strains of two production profiles and hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, *89*(5), 825–833. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01185.x>
- Kuntawee, S., & Akarapisan, A. (2015). Isolation and identification of *Aspergillus*

- species producing Ochratoxin A in Arabica coffee beans. *International Journal of Agricultural Technology*, 11(5), 1235–1242.
- Lee, K.-G., & Shibamoto, T. (2002). Analysis of volatile components isolated from Hawaiian green coffee beans (*Coffea arabica* L.). *Flavour and Fragrance Journal*, 17(5), 349–351. <https://doi.org/10.1002/ffj.1067>
- Lee, L. W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2015). Coffee fermentation and flavor - An intricate and delicate relationship. *Food Chemistry*, 185, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.124>
- Lin, M. T., & Dianese, J. C. (1976). A Coconut-Agar Medium for Rapid Detection of Aflatoxin Production by *Aspergillus* spp. In *Phytopathology* (Vol. 66, Issue 12, p. 1466). <https://doi.org/10.1094/phyto-66-1466>
- Magan, N. (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 162(3), 245–253. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0057-2>
- Mantle, P. G., & Chow, A. M. (2000). Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 105–109. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00278-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00278-6)
- Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D., & Hayes, A. W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 69(April), 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>
- 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)
- Motarjemi, Y. (2013). Encyclopedia of Food Safety. In *Encyclopedia of Food Safety* (Vols. 1–4). <https://doi.org/10.5860/choice.52-0029>
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., & Ueno, Y. (1997). Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin a in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, 9(2), 77–83. <https://doi.org/10.1080/09540109709354938>
- Odjo, S., Alakonya, A. E., Rosales-Nolasco, A., Molina, A. L., Muñoz, C., & Palacios-Rojas, N. (2022). Occurrence and postharvest strategies to help mitigate aflatoxins

- and fumonisins in maize and their co-exposure to consumers in Mexico and Central America. *Food Control*, 138(March), 108968. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108968>
- 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>
- Pennerman, K. K., AL-Maliki, H. S., Lee, S., & Bennett, J. W. (2016). Fungal Volatile Organic Compounds (VOCs) and the Genus *Aspergillus*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (Issue 2010, pp. 95–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00007-5>
- Pereira, G. V. M., Alvarez, J. P., Neto, D. P. de C., Soccol, V. T., Tanobe, V. O. A., Rogez, H., Góes-Neto, A., & Soccol, C. R. (2017). Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *Lwt*, 84, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.073>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage. In *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/10.1007/978-3-030-85640-3>
- Plog, B. A., & Quinlan, P. J. (Eds.). (2002). *Fundamentals of industrial hygiene* (5th editio).
- Poisson, L., Auzanneau, N., Mestdagh, F., Blank, I., & Davidek, T. (2018). New Insight into the Role of Sucrose in the Generation of α -Diketones upon Coffee Roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(10), 2422–2431. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04849>
- 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).
- Ramalakshmi, K., Kubra, I. R., & Rao, L. J. M. (2007). Physicochemical characteristics of green coffee: Comparison of graded and defective beans. *Journal of Food Science*, 72(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00379.x>
- Ribeiro, J. S., Augusto, F., Salva, T. J. G., & Ferreira, M. M. C. (2012). Prediction models

- for Arabica coffee beverage quality based on aroma analyses and chemometrics. *Talanta*, *101*, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.022>
- Rylander, R. (1986). Lung diseases caused by organic dusts in the farm environment. *American Journal of Industrial Medicine*, *10*(3), 221–227. <https://doi.org/10.1002/ajim.4700100306>
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Hubka, V., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J. C., Tanney, J. B., Varga, J., & Kocsub, S. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sanchez, K., & Chambers, E. (2015). How does product preparation affect sensory properties? An example with coffee. *Journal of Sensory Studies*, *30*(6), 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>
- Semmelroch, P., & Grosch, W. (1996). Studies on character impact Odorants of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(2), 537–543. <https://doi.org/10.1021/jf9505988>
- Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2008). Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*(3), 521–526. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300022>
- Silva, C. F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, *60*(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)
- Spadaro, D., & Gullino, M. L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, *91*(2), 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00380-5)
- 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>
- Takeoka, G. R., Jennings, W., Flath, R. A., & Güntert, M. (1988). Nectarine volatiles: Vacuum steam distillation versus headspace sampling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(3), 553–560. <https://doi.org/10.1021/jf00081a037>
- 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>
- 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>
- Varnam, A. H., & Sutherland, J. P. (1994). *Beverages: technology, chemistry, and microbiology* (1st ed.). Springer New York.
- Wu, Q., Kuča, K., Humpf, H. U., Klímová, B., & Cramer, B. (2017). Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during cereal-based thermal food processing: a review study. *Mycotoxin Research*, 33(1), 79–91.
<https://doi.org/10.1007/s12550-016-0263-9>
- Yeretjian, C., Jordan, A., & Lindinger, W. (2003). Analysing the headspace of coffee by proton-transfer-reaction mass-spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 223–224, 115–139. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(02\)00785-6](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(02)00785-6)
- 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*(March), 113317. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113317>

Zhu, C., Shi, J., Jiang, C., & Liu, Y. (2015). Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. *Food Control*, *50*, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.042>

ANEXOS

Figura 24

Identificación de microorganismos Aspergillus toxigenico y Aspergillus no toxigenico según clave dicotómica general de Pitt y Hocking, (2009) pag.55

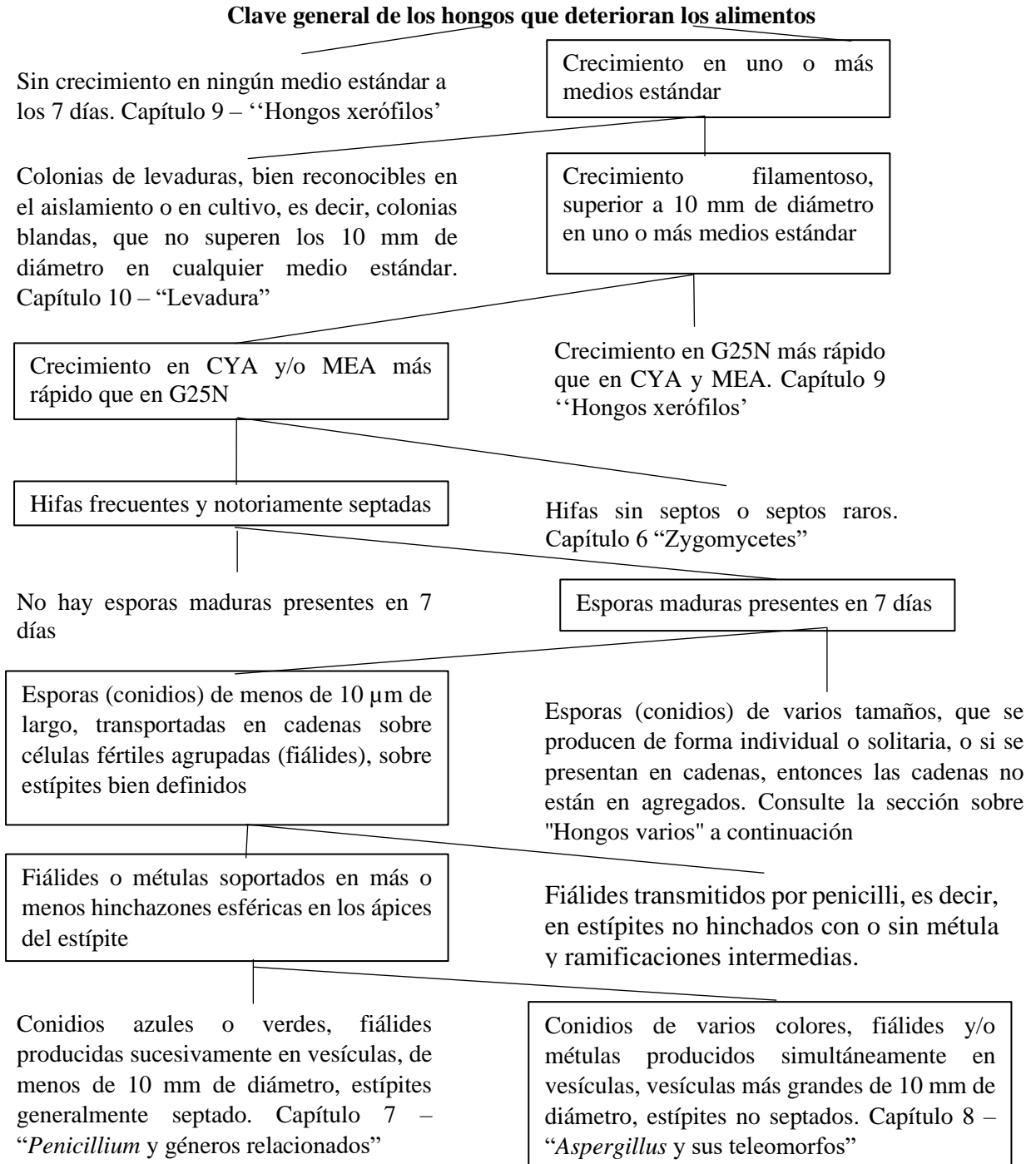
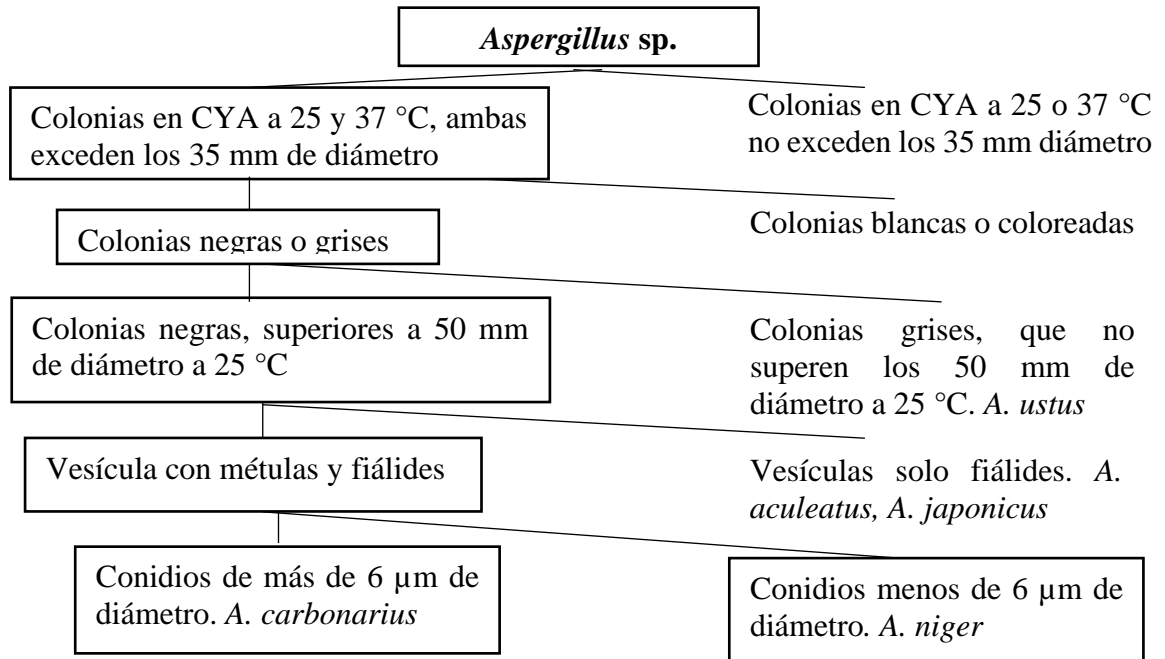


Figura 25

Clave para especies de *Aspergillus* adaptado de Pitt y Hocking (2009), pág 277



Nota. Los párrafos con recuadro lo que se sigue para la identificación de las colonias y los que están sin ello lo que se rechazó en su identificación.

Tabla 6*Preliminares de determinación de porcentaje de humedad de granos de café*

		PI	PF	PP	%	
P1	R1	GSNT	2.003	1.61	0.1	21 %
		A15min	2.051	1.717	0.32	19 %
		A1h	2.061	2	0.2	19 %
	EOP	2.007	1.727	0.75	22 %	
	R2	GSNT	2.001	1.599	0.001	20 %
A15min		2.036	1.6601	0.002	18 %	
EOP		2.071	1.6	0.003	23 %	
GSNT		2.002	1.57	0.02	22 %	
A15min		2.013	1.65	0.001	18 %	
P2	R2	EOP	2.096	1.65	0.002	21 %
		GSNT	2.003	1.58	0.012	21 %
		A15min	2.02	1.638	0.01	19 %
	R3	A15min	2.02	1.638	0.01	19 %
		EOP	2.065	1.584	0.005	23 %

Nota. Repeticiones (R1, R2 y R3). Preliminar 1 (P1) y preliminar 2 (P2). Peso inicial del café (PI); peso final del café (PF); peso de papel aluminio (PP)

Tabla 7*Preliminares de determinación de pH de los granos de café*

		R1	R2	R3	pH
P1	GSNT	6.24	-	-	6.24
	A15min	6.38	-	-	6.38
	A1h	6.31	-	-	6.31
	EOP	6.26	-	-	6.26
P2	GSNT	5.88	6.04	6.22	6.05
	A15min	6.05	5.98	5.38	5.80
	EOP	6.17	6.22	6.19	6.19

Nota. Repeticiones (R1, R2 y R3). Preliminar 1 (P1) y preliminar 2 (P2).

Figura 26

Aislados fúngicos de granos de café almacenados sembrados en medio CYA e incubados a 25 °C por 7 días; *Penicillium* spp. (24, 26, 33, 35a, 37, 38, 23, 311, 29,21, 312, 36 y 43); *Aspergillus* spp. (26, 35b, 421, 310, 32 y 421); *Fusarium* spp. (471 y 472).



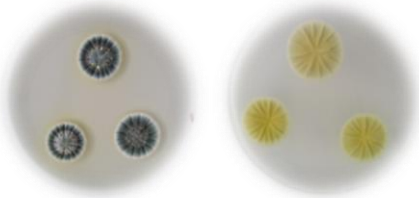

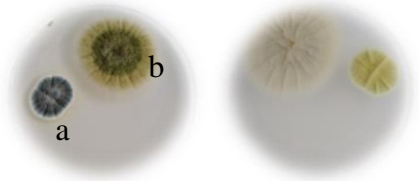
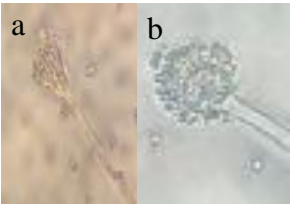
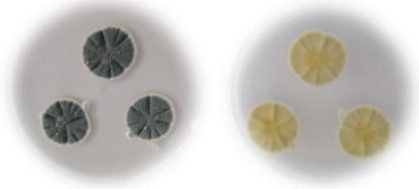

Foto macroscópica	Foto microscópica (Aumento de 400X)	Observaciones
<p>24</p> 	 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde petróleo, moderadamente denso con formaciones surcadas, con color blanco alrededor de la colonia.</p>
<p>33</p> 	 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde cerceta, moderadamente denso con formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia, presentando exudados en el centro. En el reverso presento un color amarillo pálido.</p>
<p>35</p> 	 <p><i>Penicillium(a)</i> y <i>Aspergillus(b)</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde cerceta, moderadamente denso con formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia, presentando exudados en el centro. En el reverso presento un color amarillo pálido.</p>
<p>37</p> 	 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde petróleo, moderadamente denso, con formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso presento un color amarillo pálido.</p>


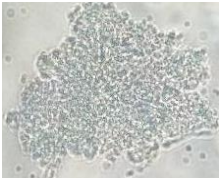
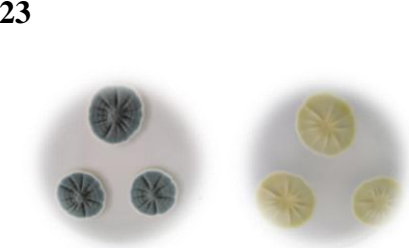
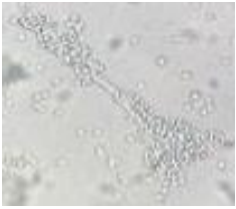

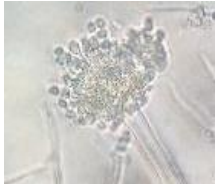


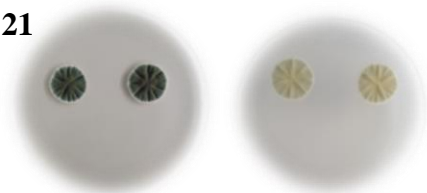



Foto macroscópica	Foto microscópica (Aumento de 400X)	Observaciones
<p>38</p> 	 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde cerceta, moderadamente denso con formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia</p>
<p>23</p> 	 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde opaco moderadamente denso con formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso de la placa se observó de un color mostaza claro.</p>
<p>311</p> 	 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde liso con formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso de la placa se observó de un color mostaza claro</p>
<p>29</p> 	 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde liso con formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso de la placa se observó de un color mostaza claro</p>
<p>21</p> 	 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde petróleo, moderadamente denso, con formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso presento un color amarillo pálido.</p>
<p>312</p> 	 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>En el anverso de la placa se observó un color verde salmón, con formaciones surcadas lisas, color blanco alrededor de la colonia y exudados en el centro de la</p>


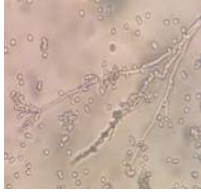

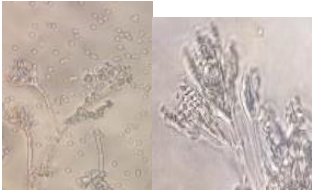



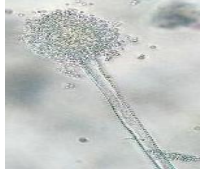

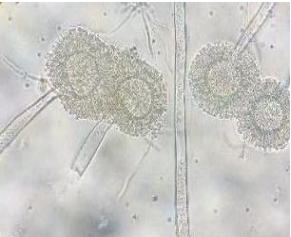
Foto macroscópica	Foto microscópica (Aumento de 400X)	Observaciones
<p data-bbox="113 423 153 456">36</p> 	 <p data-bbox="655 636 847 669"><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p data-bbox="940 286 1485 371">colonia. En el reverso de la placa se observó de un color mostaza claro</p> <p data-bbox="940 398 1485 703">En el anverso de la placa se observó un color verde opaco moderadamente denso con formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso de la placa se observó de un color mostaza claro</p>
<p data-bbox="105 757 142 790">43</p> 	 <p data-bbox="655 943 847 976"><i>Penicillium</i> sp.</p>	<p data-bbox="940 730 1485 981">En el anverso de la placa se observó un color verde salmón, con formaciones surca agrestadas esponjosas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso de la placa se observó de un color mostaza claro</p>
<p data-bbox="110 1010 146 1043">26</p> 	 <p data-bbox="655 1211 847 1245"><i>Aspergillus</i> sp.</p>	<p data-bbox="940 1055 1485 1196">En el anverso de la placa se observó un color amarillo claro con una textura esponjosa.</p>
<p data-bbox="105 1285 158 1319">421</p> 	 <p data-bbox="655 1554 847 1588"><i>Aspergillus</i> sp.</p>	<p data-bbox="940 1267 1485 1684">En el anverso de la placa se observó un color verde pasto, con una formación densa esponjosa dando la forma de aros a su alrededor, se observó formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso de la placa se observó un color crema con una mejor visualización de los surcos formados.</p>
<p data-bbox="105 1733 161 1767">310</p> 	 <p data-bbox="655 1973 847 2007"><i>Aspergillus</i> sp.</p>	<p data-bbox="940 1711 1485 2018">En el anverso de la placa se observó un color negro con una formación densa dando la forma de aros a su alrededor, se observó formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso de la placa se observó un color</p>

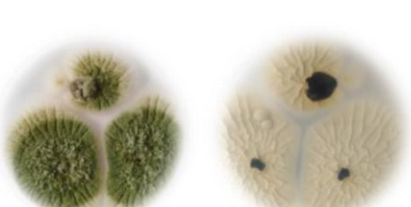
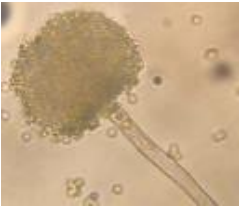
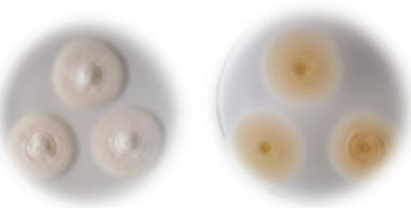


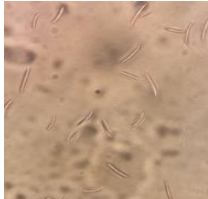
Foto macroscópica	Foto microscópica (Aumento de 400X)	Observaciones	
32			<p>crema con una mejor visualización de los surcos en la colonia</p> <p>En el anverso de la placa se observó un color verde pasto, con una formación densa esponjosa dando la forma de aros a su alrededor, se observó formaciones surcadas y un color blanco alrededor de la colonia. En el reverso de la placa se observó un color crema con una mejor visualización de los surcos formados.</p>
471			<p>En el anverso de la placa se observó un color perla, con una formación densa esponjosa, con formación abultada en la parte central. En el reverso de la placa se observó un color crema pálido donde se visualizó aros de color blanco a su alrededor.</p>
472			<p>En el anverso de la placa se observó un color rosa claro, esponjosa, surcada y abultada en la parte central. En el reverso de la placa se observó un color crema donde se visualizó aros de color blanco a su alrededor y sus formaciones surcadas</p>

Tabla 8

Preliminares de diluciones para la inoculación de Aspergillus sp. toxigénico (AT); Aspergillus sp. no toxigénico (ANT) en los granos de café

AT		ANT	
Dilución 10⁻¹	Esporas / ml	Dilución 10⁻¹	Esporas / ml
R1	1.6x10 ⁷	R1	1.5x10 ⁷
R2	1.7x10 ⁷	R2	1.6 x10 ⁷
R3	1.7x10 ⁷	R3	1.8x10 ⁷
R4	1.5x10 ⁷	R4	1.4x10 ⁷
PROMEDIO	1.6x10 ⁷	PROMEDIO	1.7x10 ⁷

AT		ANT	
Dilución 10⁻²	Esporas / ml	Dilución 10⁻²	Esporas / ml
R1	5.4x10 ⁶	R1	6.1x10 ⁶
R2	5.4x10 ⁶	R2	7.1x10 ⁶
R3	6.4x10 ⁶	R3	5.5x10 ⁶
R4	7.3x10 ⁶	R4	6.3x10 ⁶
R5	5.3x10 ⁶	R5	7.6x10 ⁶
R6	7.5x10 ⁶	R6	5.4x10 ⁶
R7	6.3x10 ⁶	R7	6.3x10 ⁶
R8	6.6x10 ⁶	R8	7x10 ⁶
R9	5.5x10 ⁶	R9	5.3x10 ⁶
R10	7.5x10 ⁶	R10	5.7x10 ⁶
R11	6.1x10 ⁶	R11	5.8x10 ⁶
R12	7.4x10 ⁶	R12	6.2x10 ⁶
PROMEDIO	6.4x10 ⁶	PROMEDIO	6.2x10 ⁶

Figura 27

Aspergillus sp. no toxigénico (ANT); Aspergillus sp. toxigénico (AT); medio DG18 °; a los 2 días (a); a los 4 días (b) de incubación a 25°C.

