

I. INTRODUCCION.

Anualmente, en Venezuela se producen grandes pérdidas en productos agrícolas tales como: granos, semillas, frutas, hortalizas, etc, debido a la contaminación por mohos los cuales están asociados a las condiciones climáticas imperantes, malas prácticas de preservación de los productos y condiciones inadecuadas de almacenamiento, que usualmente suelen presentarse en nuestro país. En Venezuela se presentan temperaturas promedio que oscilan entre los 15 y 34°C durante el año y además, posee una alta humedad relativa, lo cual favorece el desarrollo de la flora fúngica en los productos agrícolas.

El café es uno de los rubros agrícolas de mayor importancia en la región centro occidental de Venezuela y al igual que otros muchos rubros como el maíz, el arroz, las leguminosas, el cacao y la soya, este cultivo es afectado por la presencia de algunos tipos de mohos, muchos de los cuales producen efectos adversos desde el punto de vista económico y de salud. Uno de los principales problemas generados por la invasión de mohos durante la cosecha o durante el almacenamiento de los granos, es la probabilidad de que ellos puedan producir toxinas, más frecuentemente denominadas micotoxinas, las cuales ocasionan tanto en animales como en seres humanos enfermedades graves que pueden conllevar a la muerte (Mandigan y Martinko, 2006).

Los mohos pertenecen a la subdivisión de lo que se conoce como hongos. Los mohos se caracterizan principalmente por la formación de colonias de tipo algodonoso y por poseer estructuras tubulares. Los mohos se encuentran entre los principales agentes microbiológicos causales de la alteración de los alimentos. Estos, durante su crecimiento sobre el alimento, toman de este todo aquello que necesitan, tanto para su desarrollo como para producir la energía necesaria para llevar a cabo todos sus procesos vitales, provocando en el alimento, no solo cambios organolépticos, si no también: la disminución de su valor nutritivo, disminución de la capacidad de germinación en semillas o granos, pérdida de materia seca como consecuencia de la absorción de

nutrientes y agua del grano, por parte del micelio fúngico, deterioro visible y rechazo por su apariencia desagradable, alergias, y la producción de sustancias que pueden tener diversas actividades biológicas para los seres humanos y animales (Mandigan y Martinko, 2006).

Los alimentos que típicamente pueden ser alterados por mohos son muy diversos, entre los que se destacan: los cereales, semillas oleaginosas, granos, frutas, legumbres, productos cárnicos y lácteos fermentados, frutos secos, especias, productos de panadería, etc. La característica principal de estos productos es la de poseer o un bajo nivel de actividad de agua o un bajo pH, debido a lo cual es posible que dichos factores, junto al tipo de contaminación, determinan que los mohos sean capaces de desplazar a las bacterias e inclusive a las levaduras en la carrera por colonizar un alimento.

Para prevenir o controlar el desarrollo de estos microorganismos en los alimentos y así poder extender la vida útil de los productos y su inocuidad, se aplican actualmente en la industria de alimentos distintos tipos de procedimientos, que en general pueden dividirse en dos grandes grupos: a) Procesos de Tratamientos Térmicos y b) Procesos de Tratamientos no Térmicos. Uno de los tratamientos térmicos que recientemente ha cobrando mucho auge y que cada vez mas está siendo utilizado en la industria de alimentos, por sus múltiples beneficios, es el uso de las radiaciones de microondas (CYTED, 2003).

La utilización de microondas en equipos industriales por diferentes tiempos y a diferentes niveles de energía, está siendo actualmente utilizada con mucho éxito en algunos países para procesar distintos tipos de alimentos y reducir o eliminar la cantidad de microorganismos presentes en los mismos, para asegurar la inocuidad de los productos y preservar sus características de calidad por un periodo de tiempo más prolongado (CYTED, 2003).

Las microondas destruyen los microorganismos por generación de calor, sin embargo el tiempo requerido es hasta cinco veces menor que el tiempo que se necesita mediante el calentamiento convencional, y producirá alimentos con una mejor textura, sabor y apariencia (Alfaro, 2004).

Los procesos de esterilización por microondas son comúnmente usados en algunos países como Japón y Bélgica para procesar alimentos de vida de anaquel de alta calidad. El principal problema en desarrollar procesos de esterilización por microondas es la no uniformidad del calentamiento en alimentos con formas poco uniformes o regulares (CYTED, 2003).

Se puede decir en general que el uso de microondas ofrece un potencial interesante, dada la rapidez y la uniformidad del calentamiento en los productos alimenticios, una reducida degradación térmica de los nutrientes esenciales, un incremento en la retención de los factores de calidad en comparación con los procesos térmicos convencionales, una reducción o esterilización de los microorganismos presentes en un producto dado dependiendo del tiempo de exposición y la cantidad de energía irradiada sobre los mismos, por lo cual es una tecnología que puede ser ampliamente utilizada (CYTED, 2003).

El presente trabajo tiene como finalidad, evaluar la incidencia de los principales tipos de mohos contaminantes y su potencial micotoxigénico, en muestras de granos de café verde venezolano, utilizando para ello la metodología tradicional o básica para su determinación, cuantificación, aislamiento e identificación, además de someter a las muestras de granos de café verde en estudio a tratamientos mediante radiaciones de microondas, para observar el efecto que producen dichas radiaciones tanto en las muestras de granos de café verde, como en la incidencia de los mohos presentes en los mismos.

II. OBJETIVOS.

Objetivo General.

- Determinación de la micobiota presente en varias muestras de granos de café verde venezolano, provenientes de distintas regiones, evaluar el potencial micotoxigénico de mohos de la sección *nigri*, así como evaluar el efecto de la aplicación de radiaciones de microondas, en la incidencia de la flora fúngica.

Objetivos Específicos.

- Determinación de la flora fúngica y grado de infestación en muestras de café verde cosechados en Venezuela.
- Identificación de los principales mohos contaminantes y colonizantes del café verde venezolano.
- Determinación de la composición química proximal de las muestras de los granos de café verde en estudio.
- Relación entre los principales mohos aislados con algunos parámetros fisicoquímicos tales como la humedad y la a_w .
- Determinación de la presencia de micotoxinas en los granos de café verde evaluados, utilizando el método de cromatografía de capa fina (TLC).
- Aplicación de tratamientos de radiación de microondas en los granos de café verde analizados, para observar el efecto que se produce sobre la incidencia de los mohos presentes en las muestras evaluadas.

III. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1.- EL CAFÉ.

1.1.- Generalidades del Café.

El cafeto es un arbusto originario de África, específicamente de Etiopia, que comenzó a ser cultivado a mediados del siglo XII. Desde allí se difundió por Arabia y Constantinopla hasta Venecia, extendiéndose luego por toda Europa desde mediados del siglo XVII. Los mercaderes holandeses lo introdujeron en el continente Americano (Belitz y Grosch, 1985).

El primer cafeto llegó a Venezuela, sembrado por misioneros españoles asentados en la cuenca del río Caroní en 1730, y se extiende por los misioneros de la época hacia el valle de Caracas y el eje costero montañoso del norte del país. Fue más tarde, por el año de 1784 cuando se hizo la primera plantación de café en los jardines de la aldea de Chacao, en la célebre Hacienda La Floresta, propiedad de Bartolomé Blandin, la cual se encontraba en los terrenos que actualmente ocupan la Floresta, La Castellana y el Country Club de Caracas.

Sin embargo, el cultivo del café se extendió y se consolidó en los Andes venezolanos y en 1894 el café era el fruto por excelencia de toda la región andina, aportando más de la mitad del total de la producción nacional de café y llegando a ser nuestro país para esa época el segundo país productor de café a nivel mundial y el primero entre los productores mundiales de café suave o lavado.

En 1918 comienza una decadencia en el cultivo, debido a las consecuencias de las guerras mundiales, la explotación petrolera en el país y la gran producción cafetalera de Brasil. Sin embargo, aunque la producción actual del café no se compara con aquella época pasada debido a implementación de malas políticas, altos costos de producción, deficiente manejo de tierras, azotes

por plagas, entre otras muchas razones. Sin embargo el café venezolano es considerado como uno de los mejores del mundo (FEDEAGRO, 1998).

Actualmente los principales países productores de café en América son: Brasil, Colombia, México, Guatemala, El Salvador, Ecuador, Costa Rica, Honduras, Perú, Republica Dominicana, Nicaragua, Haití, Cuba y Venezuela. Y a nivel mundial lo son: Brasil, Vietnam y Colombia.

Tabla 1. Principales países productores de café verde a nivel mundial (2010).

| País | Producción (Toneladas) |
|--------------|-------------------------------|
| Brasil | 1.300.000 |
| Colombia | 747.000 |
| Indonesia | 654.000 |
| Vietnam | 561.000 |
| India | 409.000 |
| Guatemala | 348.000 |
| México | 273.000 |
| Uganda | 220.000 |
| Etiopia | 207.000 |
| Costa Rica | 194.000 |
| Honduras | 168.000 |
| Nueva Guinea | 150.000 |
| El Salvador | 142.000 |
| Ecuador | 131.000 |
| Perú | 127.000 |
| Camerún | 124.000 |
| Nicaragua | 90.000 |
| Kenia | 88.000 |
| Tailandia | 59.000 |
| Venezuela | 44.000 |

Fuente: FAO, 2010

1.2.- Características Botánicas del la Planta de Café.

El árbol del café o cafeto es una planta arbustiva perenne tropical que pertenece a la familia de las *Rubiaceae*, según la especie, alcanza alturas de 3 a 12 metros. Para facilitar la recolección, se suele dirigir su desarrollo de manera que adopte la forma de arbusto de 2 a 2,5 metros. Tiene hojas

correosas de color siempre verde con corto peciolo, lustrosas y ovaladas, sus flores son blancas y fragantes, de olor parecido al jazmín y a partir de las cuales se forman frutos en drupa semejantes a cerezas, de 1,5 cm de diámetro aproximadamente con forma ovoide elíptica, estos frutos se forman en racimos unidos a las ramas por tallos muy cortos y suelen encerrar dos semillas con forma plano convexa, con un surco en la parte media. El fruto tiene superficie rugosa, al principio es verde (cuando esta inmaduro), se colorea luego de rojo - violeta o amarillo al madurar.



Figura 1. Fruto del cafeto (*Coffea arabica*).



Figura 2. Flor del cafeto (*Coffea arabica*).

Posee un pericarpio carnoso y grueso, conformado de afuera hacia adentro por un epicarpio o exocarpio muy delgado, siendo este el que da el color al fruto maduro, luego contiene en su pulpa blanca y de sabor dulce (mesocarpio) dos semillas que se conectan por su cara lisa (a veces debido al aborto de un ovulo, se puede originar un fruto de una sola semilla, la cual tiene forma de espiral y se conoce como caracolillo o caracolito). Estas exhiben un surco y están envueltas por una membrana amarillenta, transparente y sólidamente adherida llamada tegumento que luego está recubierta por una capa cornea o apergaminada que es el endocarpio, también llamado pergamino,

que es de constitución fibrosa con un alto porcentaje de celulosa, este presenta un color amarillo pálido (Belitz y Grosch, 1985).

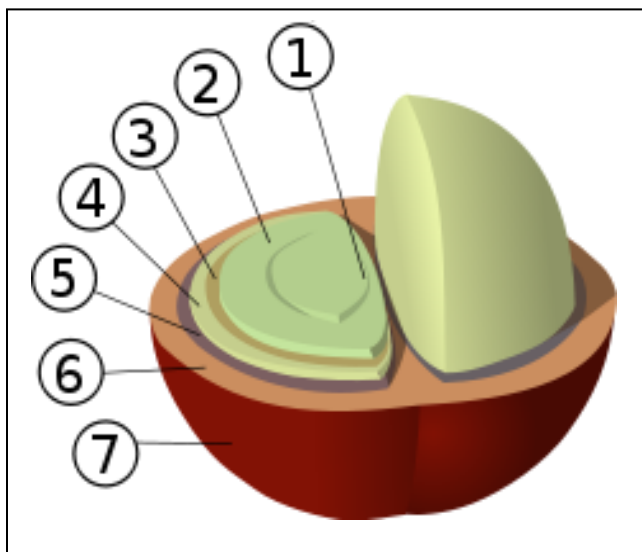


Figura 3. Estructura del fruto del cafeto: 1) Región central del grano; 2) Grano de café (endosperma); 3) Piel plateada (tegumento); 4) Pergamino (endocarpio); 5) Capa de pectina; 6) Pulpa (mesocarpio); 7) Piel exterior (epicarpio).

La composición química de la semilla de café verde presenta aproximadamente un 60% de carbohidratos, 13% de lípidos, 13% de proteínas, 12% de humedad y un contenido de cafeína entre 1 a 3 %, (Belitz y Grosch, 1985).

1.3.- El Cultivo del Café.

Para el prospero desarrollo del árbol del café están particularmente indicados los territorios tropicales de mediana altitud (temperaturas medias anuales entre 15 y 25 °C, de 600 a 1400 metros sobre el nivel del mar y clima no demasiado húmedo). Los suelos adecuados para el cultivo del café son aquellos que tienen una textura franca que permite una estructuración granular y la formación de suficiente espacio poroso, suelos muy arcillosos o muy arenosos, no son recomendables para el cultivo del café. El arbusto inicia la floración a los 3 o 4 años de edad, proporciona buenas cosechas

pasado el sexto año y alcanza su producción máxima al cabo de los 10 a 15 años. La maduración de los frutos tiene lugar de 8 a 12 meses después de la floración. La época de la recolección depende de la región, el clima y la altura. A menor altura y clima más cálido la maduración es más rápida. La temporada en la cual los frutos maduran y están listos para la cosecha varía de acuerdo con las condiciones del clima y el suelo, con las prácticas de cultivo implementadas y con la especie de la planta. La cosecha dura no menos de tres meses y el fruto se cosecha a mano cuando está completamente maduro el cual posee una coloración rojo-purpura. De las casi 70 especies existentes de café, solo se cultivan intensamente tres: *Coffea arabica* (café arábigo), *Coffea canephora* (café robusta) y *Coffea liberica* (café liberiano). La especie *Coffea arabica* aporta alrededor del 75 % de la producción mundial, *Coffea canephora* el 23% y *Coffea liberica* junto con otras especies representa el 2% restante. La cantidad de frutos del cafeto que proporcionan 1 Kg de semillas limpias de pulpa (rendimiento) es de 6,38 Kg en el caso de *Coffea arabica*; 4,35 Kg para *Coffea canephora* y 11,5 Kg en el caso de *Coffea liberica* (Belitz y Grosch, 1985).

Las diversas características del café quedan marcadas por la variedad de la planta, la altitud, la climatología, las tierras de cultivo, entre otras. Las condiciones climáticas que permiten el desarrollo del café, principalmente la temperatura y la humedad, favorecen la aparición y crecimiento de una amplia diversidad de mohos en los granos de café, ya sea desde el campo, durante la cosecha o durante el almacenamiento de los mismos, trayendo como consecuencia en la mayoría de los casos problemas de salud pública y grandes pérdidas económicas en la producción mundial. Algunos de los géneros principales de mohos que suelen encontrarse con facilidad en los granos de café son: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Silva, 1993).

El cultivo del cafeto se realiza específicamente para la obtención de sus frutos, que luego de tostadas y molidas se venden para preparar la bebida o infusión conocida como café. Alrededor de un tercio de la población mundial lo consume (caliente o frío), principalmente por sus propiedades vigorizantes otorgadas por la cafeína, un alcaloide presente en el café (0,8 a 1,5% en la variedad

arabica y de 1,6 a 2,5% en la variedad *robusta*) que produce efectos fisiológicos en el sistema nervioso y circulatorio, además de estimular actividades cerebrales y cardiacas, disminuye el sueño y la fatiga; es diurética, estimula la secreción gástrica y el corazón, pero a dosis elevadas puede ocasionar arritmias y fibrilación, nerviosismo, insomnio y gastritis; es un vasoconstrictor central y un vasodilatador coronario periférico. Su consumo produce hábito (Vélez y Valery, 1990).

1.4.- Enfermedades y Plagas Comunes del Cafeto.

Las enfermedades más importantes en las plantaciones de café son las siguientes: Roya de cafeto (*Hemileia vastatrix*), Cercospora (*Cercospora coffeicola*), Antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*), Ojo de gallo (*Mycena citricolor*), Mal de hilachas (*Pellicularia koleroga*), Llagá negra (*Rosellinia bunodes*), Poma (*Phoma costarricensis*), y mancha mantecosa. Además de estas enfermedades, el cafeto en las diferentes etapas de su desarrollo y en su carácter de cultivo se encuentra sujeto continuamente al ataque de insectos migratorios, permanentes y otras plagas. La incidencia de plagas en el cafeto es muy variada, las más comunes y que atacan el sistema radical son las siguientes: escama verde, escama coma, broca del cafeto, palomilla de la raíz del cafeto y nematodos; los cortadores y chupadores afectan las hojas; y la broca ataca a los frutos. Estas enfermedades y plagas en las plantaciones del café están ligadas a las condiciones ambientales.

1.5.- El Cultivo del Café en Venezuela.

Desde hace más de 300 años, el café ha sido un cultivo tradicional en Venezuela y se ha convertido en uno de los cultivos más importantes del mundo. El café es uno de los rubros que caracterizó al país cuando su economía se basaba en las actividades agropecuarias (fue una de nuestras principales riquezas), que se han mantenido dentro de nuestra tradición pero no con los niveles de producción que lo caracterizó en esa época (FEDEAGRO, 1998).

La especie cultivada en Venezuela corresponde a *Coffea arabica*, entre alturas de 400 a 1800 m.s.n.m (metros sobre el nivel del mar) y la variedad suele ser la *typica* (conocida en el país

también como la común, criolla o nacional). Se siembra principalmente en los Andes y en la cordillera de la Costa, uno de los sitios de mayor producción fueron los valles de Aragua.

Actualmente los principales estados productores de café en Venezuela son: Lara, Portuguesa, Táchira, Mérida, Trujillo, Monagas, Yaracuy y Zulia.

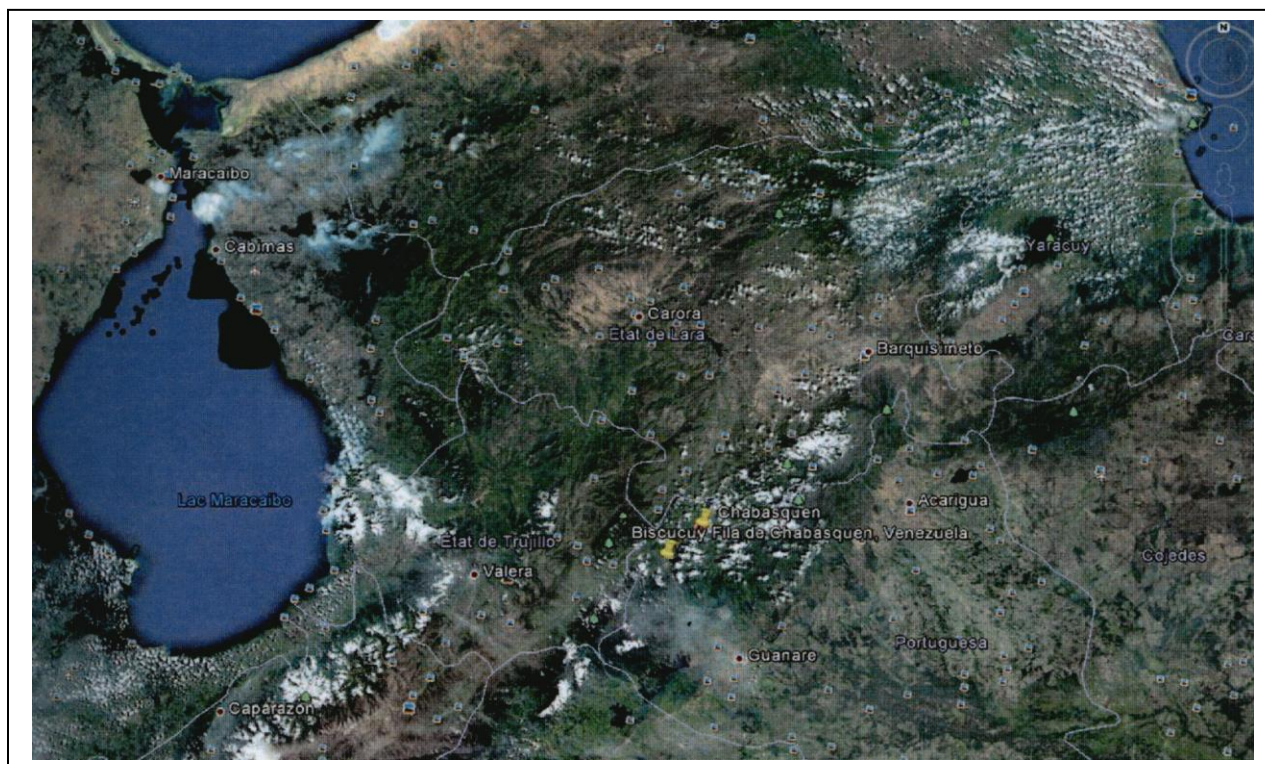


Figura 4. Fotografía satelital de las regiones de producción de granos de café en Venezuela.

Más del 80% del café que se produce en Venezuela es del tipo lavado fino o suave, el de mejor calidad se cosecha en altitudes entre los 1200 y 1700 m.s.n.m. y es el denominado café de sombra o también llamado café de altura; su grano es más pequeño y más aromático. Los cafés llamados naturales o corrientes son de inferior calidad y se obtienen secando los frutos maduros y pintones con todas sus envolturas y trillándolos después de secos (Vélez y Valery, 1990).

El café obtenido de la especie arábica es una bebida de agradable aroma, exquisito sabor, muy buen cuerpo y bajo contenido de cafeína (Vélez y Valery, 1990).

1.6.- Recolección y Tratamiento de los Granos de Café.

En el hemisferio boreal, la recolección se efectúa aproximadamente entre los meses de diciembre a febrero, mientras que al sur del ecuador se lleva a cabo en los meses de mayo a agosto. Los frutos se recolectan a mano y se amontonan en el suelo (Figura 5 y 6), siendo luego particularmente necesario eliminar la pulpa, lo que se realiza por dos procedimientos: Método seco y método húmedo.



Figura 5. Recolección manual de los frutos (pepiteo o desgrane).

Figura 6. Frutos maduros colocados en el suelo.



Método Seco: En la preparación seca, que es la practicada casi exclusivamente en Brasil (primer país productor de café en el mundo), los frutos recién recolectados se llevan a terrazas de desecación, en las que se extienden y dejan secar al sol hasta que las semillas se desprenden de la cascara, el café así obtenido se conoce como café natural o corriente (Belitz y Grosch, 1985).

Este método es empleado por la mayoría de las regiones productoras de café en todo el mundo. Los resultados son menos favorables en comparación con los resultados obtenidos mediante la aplicación del método húmedo.

En el procedimiento seco las cerezas son expuestas al aire libre y removidas con regularidad para que puedan secar completamente (Figura 7 y 8). Después de algunos días se puede oír rodar los granos dentro de las cerezas, en ese momento el café está en cascara, también se le conoce con el nombre de bola seca o parapara (Figura 9). En este momento el café ya está listo para ser pelado mecánicamente.



Figura 7. Cerezas de café maduras colocadas al aire libre para ser secadas al sol.



Figura 8. Frutos del cafeto después de varios días de ser secados al sol.



Figura 9. Cerezas del cafeto secas (bola seca o parapara).

Con maquinas descascaradoras (tornillos sin fin cónicos) se retira tanto la pulpa desecada como el endocarpio y en lo posible el tegumento. El café descascarado y limpio se clasifica y se envasa en sacos de 60 Kg (Figura 10 y 11).

También es frecuente apilar los frutos frescos en montones, en los que se dejan fermentar durante 4 días por autocalentamiento, tratándose después en la forma ya descrita. En ambos casos se obtiene café sin lavar (Belitz y Grosch, 1985).



Figura 10. Granos de café verde.



Figura 11. Almacenamiento en sacos del café verde.

Método Húmedo: La preparación húmeda es más cara, más moderna y habitual en los cafés *arabica*, sobre todo en América Central, Colombia y África. Una vez cosechados los frutos, estos son colocados en tanques con agua donde se realiza una primera selección, los granos livianos flotan y son descartados, los más pesados se van al fondo, garantizando que sus lóbulos están llenos. El siguiente paso es la eliminación del epicarpio y mesocarpio. En este método se llevan los frutos al despulpador, que mediante un sistema de discos y rodillos graduables de superficie áspera, eliminan por compresión la pulpa sin dañar las semillas (la pulpa sirve como abono).



Figura 12. Despulpado de los frutos del café.

Las semillas así obtenidas todavía contienen, además del endocarpio y el tegumento, considerable cantidad de pulpa. Estas deben colocarse en agua para realizar una segunda selección, eliminando los granos que floten. Después de realizar este proceso se procede a la eliminación total del mesocarpio dejando fermentar de 12 a 24 horas los granos en tinajas de fermentación por las que discurre una corriente de agua, con cuyo procedimiento se afloja y descompone la pulpa residual bajo la acción de las enzimas pectinolíticas propias del café, y en ocasiones con la participación de microorganismos, pudiendo eliminarse después fácilmente por lavado. Posteriormente las semillas se pasan por tamices y se colocan en suelos de cemento, en los que se secan al sol (Figura13), a la sombra o mediante aire caliente. Luego de secada la semilla, debe conservarse el pergamino, ya que esta película le confiere protección al grano contra daños mecánicos, de insectos y regulación de la ganancia o pérdida de humedad durante el almacenamiento. De esta forma se obtienen las clases de café lavado (mild), los granos más valiosos pasan a la etapa de calibrado y de pulido antes de ser empaquetados para la venta. Estos se pulen con frecuencia para la completa eliminación del tegumento y el abrillantado de la superficie del grano, este proceso se conoce como curado (Belitz y Grosch, 1985).



Figura 13. Secado al sol durante varios días de los granos de café después del lavado.

1.7.- Clases de Café Crudo.

De las tres especies antes citadas de café se conocen unas 80 variedades. Las variedades más importantes de la especie *Coffea arabica* son las: *typica*, *bourbon*, *maragogips* y *mocca*; de la *Coffea canephora*, las variedades: *robusta*, *typica*, *uganda* y *quillón*. Todas las variedades de *Coffea canephora* se presentan como de la variedad *robusta* en el mercado (Belitz y Grosch, 1985).

Por lo común, el café verde o crudo se denomina de acuerdo con su origen, es decir, por el país de procedencia o por el puerto de embarque. Importantes productores de café *arabica* lavado son: Kenia, Tanzania, Colombia, Salvador, Guatemala y México. Mientras que el café *arabica* sin lavar como el café suave de Santos y el fuerte de Rio y Bahía, son provenientes de Brasil. La mayoría de los *robustus* sin lavar provienen de Angola, Uganda, Costa de Marfil y Madagascar.

La calificación del café crudo (categorización) se realiza atendiendo al aroma y sabor, pero además examinando el tamaño, color, forma, consistencia y corte de los granos. Tachas principales (defectos e imperfecciones) son sobre todo los granos deficientes, que deben retirarse

cuidadosamente, puesto que alteran ostensiblemente el sabor del conjunto y, por lo menos, pueden perjudicar el aspecto del café. Se trata sobre todo de semillas inmaduras (granos en hierba), que en el tostado se tornan pálidos, de granos excesivamente fermentados, cuyo deficiente sabor obedece, entre otras causas, al ácido acético, acetoina, diacetilo, butanol e isobutanol que contiene, semillas congeladas y verdes; granos dañados por la lluvia o los insectos, así como granos resacos. Uno solo de estos granos altera todo un extracto de café. Otros defectos del café son sobre todo los productos enmohecidos y terrosos (granos deficientemente desecados). Los cafés de zonas altas son en general más apreciados que los de tierras bajas (Belitz y Grosch, 1985).

La composición del café crudo depende de cuál sea la clase de este, su origen, obtención e influencias climáticas (Belitz y Grosch, 1985).

1.8.- El Café Tostado.

Las semillas crudas del café o también conocidas como verdes, necesitan ser tratadas térmicamente, a cuyo proceso de calentamiento se le llama tostado, esta es una etapa obligatoria y de gran importancia; dicho proceso es el que proporciona el producto de consumo propiamente dicho que es el café. El tostado consiste en pasar los granos de café por una fuente de calor para así tomar el color y el aroma característico con que se le conoce. Ese aroma se debe a la formación de un aceite esencial denominado Cafeona, después de la volatilización de los ácidos oleico, esteárico y tánico. Durante el proceso no se debe permitir que los granos se quemen ya que pierden esos aceites esenciales y además el aroma y cuerpo de la bebida. Durante el tostado se producen en la zona térmica de los 200-250°C profundas transformaciones, caracterizadas al exterior por un aumento de volumen (50-80%), modificaciones estructurales y del color, disminución del peso (mermas por tostado, 13-20%) y especialmente por la formación de un aroma típico que no existe en los granos verdes (aroma y sabor a “tostado”). El café tostado flota en la superficie del agua al agregarse a esta, mientras que el café crudo se hunde. Los granos crudos son correosos, duros y difícilmente fermentables, pero con el tostado se hacen quebradizos y blandos.

En el proceso del tostado se distinguen cuatro fases principales: desecación, crecimiento, disgregación y tostado completo.

El tostado se caracteriza por la disminución de los componentes originales y por la aparición de otros nuevos. La realización del tostado requiere mucha práctica y habilidad, a fin de lograr un tostado uniforme y una óptima producción del aroma, a la vez que se evitan las anomalías derivadas del tostado excesivo y requemado del café (Belitz y Grosch, 1985).

La torrefacción a nivel comercial se realiza en plantas modernas, que utilizan controles computarizados para el tostado, clasificación y molienda. Cada clase de grano tiene un tiempo y tipo de tostado óptimo, cuyas variaciones alteran el sabor final.

Después de tostado el café sigue liberando gases, por lo tanto debe pasar por un proceso de desgasificación. Después de reposar será molido o envasado dependiendo del tipo de utilización a la que este determinado. Durante esta etapa se puede destruir hongos toxigénicos presentes en el grano de café, sin embargo, podría permanecer cualquier metabolito tóxico como la Ocratoxina A producida por alguno de los hongos (Carrara, 2003).

1.9.- Almacenado y Envasado del Café.

El café tostado se selecciona a mano en mesas, para separar los granos defectuosos, operación que en los grandes establecimientos tostadores se efectúa por procedimiento fotoeléctrico completamente automático. El café tostado del comercio es una mezcla de 4 a 8 procedencias distintas que debido a su diferente comportamiento, deben tostarse generalmente por separado. Con el nombre de moca se designan por lo común las mezclas particularmente fuertes.

Mientras que el café crudo o verde puede guardarse almacenado de 1 a 3 años (bajo buenas condiciones de almacenamiento), el café tostado de los envases comerciales ordinarios solo conserva su frescura de 8 a 10 semanas. El aroma de tostado disminuye, a la vez que progresa un

regusto a rancio (envejecimiento). El café molido envasado fuera del contacto del aire se conserva durante 6 a 8 meses, si bien pierde sus mejores cualidades en el plazo de 1 a 2 semanas una vez abierto el envase (Belitz y Grosch, 1985).

El contenido de humedad para el almacenamiento satisfactorio del grano de café verde no debe exceder del 11%, nivel al cual el desarrollo de hongos y la actividad enzimática general es mínima. Si la humedad relativa del aire dentro de la estructura del almacén se aproxima a 75% (lo cual es equivalente a un contenido de humedad del grano de café verde de 13%), una gran variedad de hongos como *Rhizopus* y *Aspergillus* sp. empezaran a desarrollarse. Aunque la mayoría son inocuos, algunos son productores de micotoxinas, las cuales pueden producir insuficiencia renal y carcinogénesis (tumores en el hígado), entre otros muchos trastornos en la salud, a pesar de encontrarse a muy bajas concentraciones (Mabbett, 2002).

Una humedad relativa del aire que excede del 85% en el almacén o depósito (lo cual equivale a un contenido de humedad en el grano de café de 18%) levaduras, mohos y bacterias aparecerán con pudrición húmeda sistemática y destrucción de los granos (Mabbett, 2002).

La ocratoxina A (OTA) es la principal micotoxina que suele encontrarse en los granos de café verde (Mabbett, 2002). Los factores que afectan la formación de las micotoxinas son la humedad y la temperatura. Es prácticamente imposible excluirlos y la única manera disponible de hacerlo, es asegurarse que los granos de café nunca estén en las condiciones combinadas de temperatura y humedad que estimulen el crecimiento de estos particulares mohos y su producción de OTA (Mabbett, 2002).

Los efectos patológicos de la ocratoxina A están referidos a que es un potente agente nefrotóxico, cancerígeno, necrotóxico, teratogénico, inmunosupresivo y genotóxico, cuyos efectos

en el metabolismo animal, dependen de muchos factores como: la especie, el sexo y la edad (Mabbett, 2002).

1.10.- Flora Fúngica Presente en Granos de Café Verde.

Existen una serie de factores que favorecen el crecimiento de los mohos, entre los cuales podemos mencionar: la temperatura y humedad del ambiente durante el cultivo, cosecha y almacenamiento de los granos de café; contenido de humedad del grano; disponibilidad del inoculo en el ambiente de los mohos invasores, interacción entre las poblaciones de insectos infestantes y el grano en estado de desarrollo; daño físico ocasionado por la acción de los insectos, pájaros, maquinas de cosecha y transporte; variabilidad genética en cuanto a la susceptibilidad de los granos a la infección de los mohos.

Poisson y col., 1975 (citado por Abreu, 2004) reportaron la presencia de especies de *Aspergillus* y *Penicillium* en granos de café verde procedente de Angola. En un estudio realizado por Corte Dos Santos y col., 1971 (citado por Abreu, 2004) bajo condiciones de un 92% de humedad relativa y 26°C, muestras de café verde cultivado en Angola y almacenado durante tres meses, la micobiota presente estaba constituida por: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus glaucus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium brevicompactum*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Scopulariopsis* y *Sporendonema*.

Levi, (1980) señaló que las principales especies de mohos visibles en granos de café verde eran: *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. wentii* y *A. versicolor*, y señala que solamente la ocurrencia natural de aflatoxinas, ocratoxina A y esterigmatocistina ha sido estudiada.

Mislivec y col., (1983) analizaron la flora fúngica de 944 muestras de café verde provenientes de 31 países productores, entre ellas cinco muestras de café venezolano, y reportaron que el grado de mohosidad en el caso del café venezolano sin desinfectar fue de 97,2% y en granos desinfectados de 54%. Estos resultados indican el gran peligro potencial a la salud pública que

puede estar presente en los granos de café, debido a la alta incidencia de especies fúngicas productoras de micotoxinas. De igual manera un alto grado de mohosidad como el obtenido en este estudio imparte características sensoriales desagradables al producto y genera grandes pérdidas económicas.

Casanova, (2004) realizó un estudio en el cual evaluó 47 muestras de granos de café verde procedentes de tres regiones cafetaleras de Venezuela (Caripe, Barquisimeto y Santa Cruz de Mora), obtuvo como resultado una incidencia de mohos a nivel superficial del grano de 10^4 UFC/g y un grado de colonización del 75%. Los mohos encontrados en los granos evaluados fueron: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium spp.*; predominando principalmente *Aspergillus niger*. En este mismo estudio se evaluó también la presencia de una micotoxina en el café verde, la ocratoxina A (OTA), obteniendo que un 85% de las muestras arrojaron resultados positivos para la presencia de esta micotoxina y que un 21% de los granos la contenían en niveles superiores a los permitidos por la Comunidad Europea ($5\mu\text{g}/\text{Kg}$).

En otro estudio similar realizado por Abreu, (2004) en el cual se evaluó la micobiota presente y los niveles de ocratoxina A, en 25 muestras de café verde (sin procesar) provenientes de 15 lotes distintos y en el producto luego del proceso de torrefacción (tostado y molienda). Se obtuvo que la incidencia total de mohos para el café verde fue de $1,6 \times 10^4$ UFC /g, para el café tostado fue de $5,2 \times 10^2$ UFC/g y para el café molido fue de $1,9 \times 10^2$ UFC/g. La totalidad de las muestras analizadas de café verde presentaron una alta colonización interna, entre niveles de 76 y 100%, siendo el porcentaje promedio de 93,6 %. La micobiota predominante antes de la desinfección de los granos de café verde fue: *Aspergillus nigri*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus ochraceus* y luego de la desinfección: *Aspergillus nigri*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus flavus*. Se determinó que en el café verde el 60% de los granos presentaba OTA pero solo un 6,7% de las muestras sobrepaso el límite máximo permitido por la Comunidad Europea. De las muestras de café tostado y molido analizadas, todas presentaron niveles de ocratoxina A, sin

embargo ninguna de las muestras sobrepaso el límite máximo permitido por la comunidad Europea (3µg/ Kg).

La presencia de mohos en un alimento no implica necesariamente la presencia de micotoxinas, sino que indica un riesgo potencial de contaminación. Las condiciones que permiten la producción de las toxinas afortunadamente son más restringidas en comparación con aquellas que permiten el crecimiento del hongo. Pero por otra parte, la ausencia de mohos toxicogénicos no garantiza que un alimento esté libre de micotoxinas, pues estas persisten aun cuando el moho haya perdido su viabilidad.

2.- LOS MOHOS.

2.1.- Importancia de los Mohos en los Alimentos.

Se conoce con el nombre de mohos a ciertos hongos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se reconoce por su aspecto aterciopelado o algodonoso.

Los hongos comprenden un gran grupo de microorganismos que invaden y descomponen los alimentos cosechados o procesados, pudiendo en algunos casos producir metabolitos secundarios que son tóxicos (micotoxinas).

Los hongos de importancia en la industria de alimentos y bebidas pueden ser clasificados como Eumicotas u hongos verdaderos. Tradicionalmente estos a su vez han sido divididos en tres clases: Phycomycetos, Ascomycetos y Basidiomycetos basados en el modo de producción de las esporas sexuales, y con los Deuteromycetos (hongos imperfectos), reservado para microorganismos a los cuales no se les conoce etapa sexual. Siendo los Ascomycetos junto con los Deuteromycetos, los principales grupos de mohos causantes del deterioro de alimentos (Martínez, 1991).

Los granos y cereales constituyen un sustrato muy adecuado para el desarrollo de diversas especies de hongos. Los mohos toxigénicos están en todas partes. Ellos son fácilmente diseminados a través de sus esporas vegetativas, las cuales son producidas en grandes cantidades y pueden estar presentes en estado latente por largos periodos de tiempo (Northolt y Bullerman, 1982).

La importancia de la contaminación de granos con mohos puede ser resumida en seis puntos básicos como: cambio de color de los granos, disminución del poder germinativo, enmohecimiento, cambios bioquímicos, contaminación con micotoxinas y la pérdida de peso (Martínez and Resnik, 1994).

El cambio de color de los granos está ligado al predominio de varios grupos de mohos, tal cambio de color se debe a la alta actividad metabólica de organismos criptogámicos, o a la combinación de diversas especies, estos organismos actúan indirectamente sobre los pigmentos existentes o directamente haciendo ellos mismos la síntesis de los pigmentos, en las condiciones que favorecen esta actividad metabólica.

2.2.- Clasificación y Descripción de los Mohos.

De acuerdo a Bullerman y col, (1984); los hongos invasores de los granos se clasifican de acuerdo a sus requerimientos de humedad, aunque según otros autores, no se considera estricta dicha clasificación:

Hongos de Campo: Aquellos que invaden el grano en desarrollo o ya maduro mientras se encuentra en la planta y antes de que sea cosechado cuando el contenido de humedad es alto, entre 20 y 40%. Ejemplos de estos son algunas especies de *Fusarium sp.*

Hongos de Almacenamiento: Aquellos que se desarrollan sobre o dentro del grano a los niveles de humedad predominante en el almacenamiento de 13 a 19%. Después de la cosecha, los hongos de almacenamiento pueden desarrollarse sobre los productos agrícolas si las condiciones

son favorables. La mayoría de estos hongos pertenecen a los géneros *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*, los cuales pueden adaptarse a bajas condiciones de humedad (Northolt y Bullerman, 1982).

Hongos de Descomposición Avanzada: Se desarrollan en el grano luego que este ha sufrido un deterioro considerable durante el almacenamiento y requieren niveles de humedad de 20 y 25% para su crecimiento. Se ha asociado particularmente especies tóxicas como *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Fusarium sp.*

De las aproximadamente 100.000 especies de hongos que se conocen en la actualidad, la mayoría de las especies toxinogénicas caen dentro de tres reconocidos géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

***Aspergillus sp.*:** Este género según Frazier, (1976); se caracteriza por ser septado, con micelio modificado y generalmente incoloro. Presenta una parte aérea fértil y una no aérea vegetativa. Los conidióforos son septados o no, surgiendo a partir de una célula basal, encontrándose en una vesícula final donde nacen los esterigmas, a partir de los cuales nacen los conidios. El conidio puede ser simple o compuesto, con color o incoloro. Los conidios en cadena son generalmente de color verde, marrón o negro. El género *Aspergillus* es el más amplio, con una extensa diversidad de especies que se hallan ampliamente distribuidos en todo el mundo, pero principalmente ocupan climas tropicales y subtropicales por su capacidad de crecer a altas temperaturas y bajos contenidos de actividad de agua. Muchas especies producen micotoxinas (Jay, 2002).

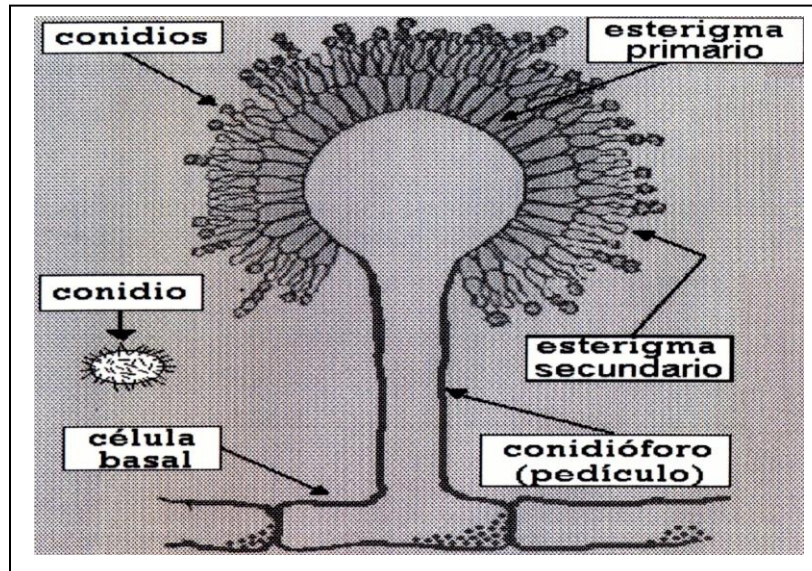
***Fusarium sp.*:** Las especies del género *Fusarium* son hongos filamentosos dermatofílicos de la clase Deuteromicetes, que se encuentra principalmente en el suelo, lo que puede implicar que la producción de toxinas sea bajo las condiciones de cultivo.

Este género se caracteriza por presentar varias celdas que forman macroconidios falsiformes que pueden ser coloreados pero no muy oscuros. Una celda ovoide o microconidio oblongo usualmente está presente, el cual puede nacer de forma individual o en cadena. Las especies de *Fusarium* son capaces de crecer a bajas temperaturas, entre 2,5 y 5 °C y su temperatura óptima varía de 22,5 a 27,5 °C (Jay, 2002).

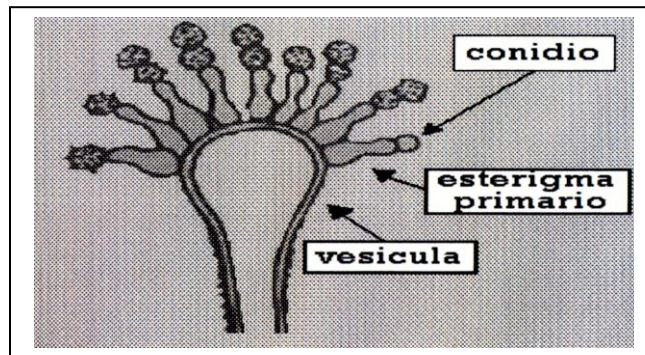
Fusarium es el género más complejo con especies adaptadas a un amplio rango de hábitats. Muchas especies son importantes patógenos de plantas. Pocas especies son importantes productoras de micotoxinas (Jay, 2002).

Penicillium sp.: Se caracterizan por ser septados, de micelio ramificado generalmente incoloro. Conidióforos aéreos septados que son perpendiculares a las hifas sumergidas, de las que se originan y de las que están aisladas por un tabique. Pueden ser ramificados o no. Cabezuelas de esporas semejantes a pinceles, con esterigmas o fialides que nacen en racimos y esencialmente en un solo plano. De cada esterigma surge una cadena de conidios al separarse uno a uno del palo apical del esterigma. Los conidios de la mayoría de las especies son verdes cuando jóvenes, pero más tarde pueden volverse parduscos (Frazier, 1976).

Penicillium generalmente crecen y pueden producir micotoxinas en un rango de temperatura más amplio en comparación con las especies del género *Aspergillus*, sin embargo son más abundantes en climas templados (Jay, 2002).



(a)



(b)

Figura 14. Principales estructuras morfológicas del genero *Aspergillus*.

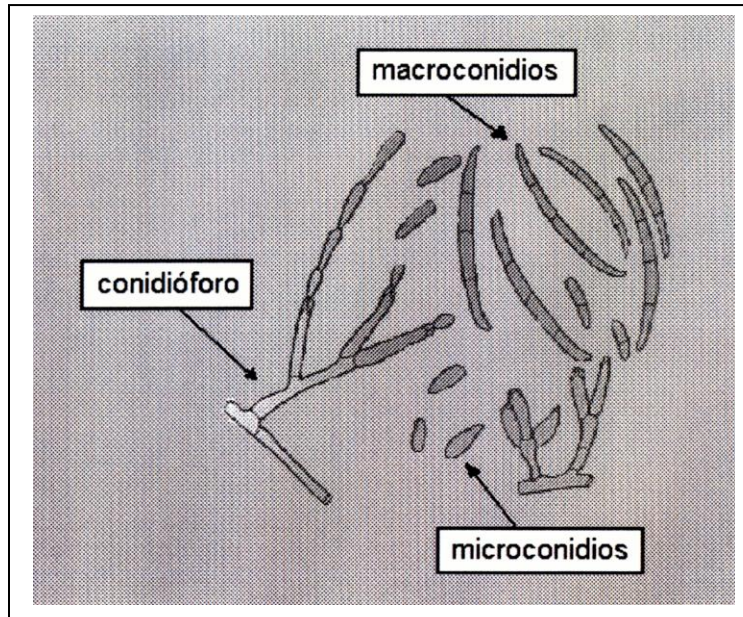


Figura 15. Principales estructuras morfológicas del genero *Fusarium*.

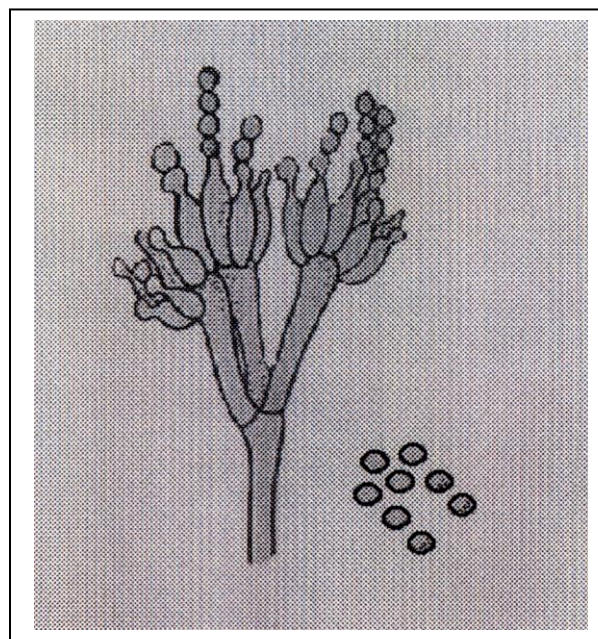


Figura 16. Diagrama de estructuras del genero *Penicillium*.

2.3.- Micotoxinas.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos que tienen estructuras muy diversas y se producen al final de la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria de crecimiento de algunos mohos, las cuales carecen de importancia aparente para el microorganismo que los produce con respecto a su desarrollo, pero representan un peligro por sus efectos tóxicos sobre la salud de seres humanos y animales. Las micotoxinas se forman cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos. De forma general, se ha determinado que su producción se produce cuando acumulan grandes reservas de aminoácidos, acetato, piruvato, etc. Representan un mecanismo para reducir la reserva de precursores metabólicos que sus necesidades metabólicas ya no demandan.

Las toxinas de los hongos se diferencian de las de origen bacteriano, asociadas a intoxicaciones alimentarias, dado que estas últimas, en su mayoría son macromoléculas tales como, proteínas, polisacáridos, etc; en cambio la composición química de las micotoxinas es mucho más simple que las toxinas bacterianas. Consisten de un solo anillo heterocíclico sencillo, con peso molecular bajo y no se comportan como antígenos completos. Por otra parte, presentan una estabilidad frente a agentes físicos y químicos que las hacen muy difíciles de eliminar una vez que han sido producidas en los alimentos. En contraste con las bacterias, las toxinas producidas por los hongos no muestran la misma especificidad de especie, es decir, resulta notable la diversidad de hongos que sintetizan una determinada micotoxina.

Muchos tipos de metabolitos tóxicos han sido obtenidos a partir de mohos cultivados en laboratorios. Dentro de las micotoxinas más importantes asociadas a los alimentos (causando daño al consumidor) están principalmente las: aflatoxinas, ocratoxinas, zearaleona, DON y las fumonisinas (Northolt y Bullerman, 1982).

La exposición de humanos a las micotoxinas puede resultar de manera directa por la ingestión de alimentos contaminados, o indirectamente por el consumo de alimentos provenientes de animales alimentados con piensos contaminados.

Por otra parte, Burdaspal (1979) señaló que la ausencia del moho visible no garantiza que no esté presente la toxina, ya que el micelio ha podido destruirse o extraerse a través de diversas manipulaciones como la cosecha, el lavado, el secado y hasta la esterilización, y las toxinas permanecer inalteradas en el alimento. Aunque por otra parte la presencia del hongo no indica necesariamente la presencia de la toxina.

Las micotoxinas si son ingeridas pueden causar efectos inmunosupresivos, teratogénicos (provocan deformaciones en embriones en desarrollo), neurotóxicos, carcinogénicos (causan mutaciones), dermonecróticos, nefrotóxicos, hepatotóxicos que pueden ser agudos o crónicos tanto en humanos como en animales. Las enfermedades causadas por las micotoxinas son llamadas micotoxicosis. La contaminación de alimentos además de ocasionar problemas en la salud, también acarrear pérdidas considerables desde el punto de vista económico (Samson y col. 1995).

La ocratoxina A (OTA) es la principal micotoxina que suele encontrarse en los granos de café verde (Mabbett, 2002).

2.4.- Las Ocratoxinas y su Detección.

Las ocratoxinas son un grupo de metabolitos estructuralmente similares, producidas principalmente por *A. ochraceus*, *A. niger* y especies relacionadas, así como por *P. verrucosum*. La más importante dentro del grupo es la ocratoxina A, la cual ha sido asociada como factor en la etiología de la enfermedad humana conocida como Nefropatía Endémica Balcánica.

Esta toxina ha sido encontrada en maíz, caraotas, semillas de cacao, judías, tabaco, cebada, jamones curados, granos de café, frutas cítricas, entre otros (Jay, 2002).

Las ocratoxinas abarcan una familia de toxinas (A, B y C) cuya estructura molecular consiste en un núcleo de isocumarina unido a una molécula de L-fenilalanina mediante un enlace amida.

La ocratoxina A (Figura 17) es un compuesto cristalino incoloro de peso molecular (PM) de 403,82 daltons y de fórmula química $C_{20}H_{18}ClNO_6$. Su espectro de absorción varía con el pH y la polaridad del solvente. Un máximo en el espectro de emisión fluorescente puede ser observado en 428nm (EMAN, 2003).

La disponibilidad de métodos de análisis juega un rol clave en el estudio e investigación de micotoxinas. se han desarrollado procedimientos tanto químicos como biológicos, sin embargo los ensayos químicos son de mayor importancia para la determinación de las micotoxinas.

Actualmente los métodos químicos más usuales para determinar ocratoxina A son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC) y ensayos inmunoquímicos.

Los procesos cromatográficos involucran una partición del soluto entre dos fases, una fase estacionaria (usualmente el soporte cromatográfico) y una fase móvil (líquido o gas), que lleva a la sustancia para ser separada a través del soporte cromatográfico. La fase estacionaria retarda más o menos el progreso de las sustancias a través del soporte, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, esto hace que la separación quede registrada (Samson y col., 1995).

La cromatografía en capa fina (TLC) es un método utilizado principalmente de manera cualitativa o semicuantitativa en base a la comparación con soluciones de estándares de micotoxinas

de concentración conocidas. La fase estacionaria consiste de una capa fina de partículas adsorbentes unidas a una placa o soporte en donde la fase móvil viaja a través de la misma por fuerzas de capilaridad, realizando la separación del compuesto de forma perpendicular a la línea base.

Sobre la placa se colocan cantidades del extracto de la muestra de interés y del estándar con una micropipeta en posición vertical con el extremo inferior en contacto con el solvente. Después de la migración de la fase móvil hasta determinada distancia, la placa se deja secar para posteriormente ser observada bajo luz visible o luz ultravioleta (UV) de onda larga (UV-366) o de onda corta (UV-254) dependiendo de la toxina (Samson y col., 1995).

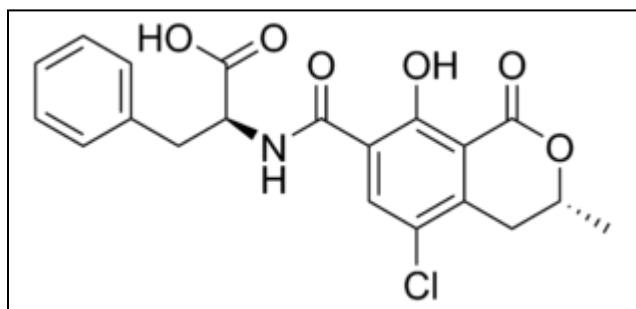


Figura 17. Estructura química de la Ocratoxina A.

2.5.- Factores que Influyen en la Formación de Micotoxinas.

Entre los factores que favorecen la formación de micotoxinas se encuentran: la luz, daños mecánicos a los granos, microclima (composición de la atmosfera gaseosa), fungicidas, composición del sustrato, competición microbiológica, genética de la especie, etc. Estos factores se pueden encerrar en tres categorías: físicos, químicos y biológicos. Además de la presencia de nutrientes, los factores más importantes en la formación de micotoxinas en productos almacenados son quizás la humedad y la temperatura. La producción de micotoxinas se ve favorecida por la alta humedad. La mínima actividad de agua (a_w) sobre la cual se muestran activos los hongos no suele sostener el de las bacterias, aunque hay que destacar que los niveles mínimos que permiten su desarrollo no suelen coincidir con los que conducen a la síntesis de la toxina. El rango de temperatura entre 25 y 30°C es el óptimo para su crecimiento (Abreu, 2004).

La actividad de agua (a_w) es una medida del “agua libre” del alimento disponible para el crecimiento del hongo. Esta “agua libre” que mide la a_w se define como la relación de la presión parcial de vapor del alimento dividida entre la presión de vapor del agua pura, ambas presiones a la misma temperatura ($a_w = p/p_o$). A la presión de vapor del agua pura se le ha dado arbitrariamente el valor de 1. Los hongos generalmente pueden crecer a una a_w mucho menor en comparación de las bacterias.

Tanto las altas y bajas temperaturas pueden proporcionar una efectiva medida de control microbiológico, ya que la mayoría de los mismos poseen temperaturas óptimas de crecimiento entre 20 y 30 °C, pero el efecto sobre los productos debe ser considerado. Las altas temperaturas pueden destruir las esporas que se encuentren en los productos y quizás también podría destruir toxinas producidas por ciertos microorganismos y las bajas temperaturas tienden a retardar el crecimiento de los microorganismos (Abreu, 2004).

2.6.- Medios Utilizados para la Determinación de Hongos.

Numerosos métodos han sido utilizados para la investigación y/o enumeración de mohos, sin embargo, el método a utilizar va a depender de la naturaleza y tipo de muestra, si se requieren o no datos cuantitativos, si el análisis es de rutina o no, así como también dependerá de la existencia o no de métodos establecidos por las agencias reguladoras (Martínez, 1991).

Los medios de cultivo para el aislamiento de hongos son de tres tipos:

Medios de contaje o propósito general, los cuales permiten el desarrollo de la mayoría de los tipos de microorganismos encontrados. Entre los cuales se encuentran: el agar Extracto de Malta, agar Micológico, agar Papa Glucosado, agar Czapek y el agar Saboraud, entre otros.

El Agar Extracto de Malta (MEA) es un medio de contaje o propósito general, en donde no hay restricciones tan exigentes de crecimiento, ya que la mayoría de los microorganismos puede

desarrollarse. Este medio en muchas ocasiones puede ser esencialmente modificado y es recomendable acidificar el medio a pH 3,5 - 4, para establecer un control sobre el crecimiento bacteriano.

El Agar Czapek contiene trazas de solución de algunos metales como el cobre, magnesio y zinc, las cuales permiten observar los colores típicos de las colonias de mohos de las especies de *Penicillium* y *Aspergillus* sp. que por lo general en otros medios no suelen desarrollar la coloración verde típica característica de sus colonias.

Todos los medios que se tienen como de propósito general pueden hacerse selectivos con tan solo modificar el pH y añadiendo al medio un agente antibiótico u otros inhibidores químicos que combata la microflora no deseada, King y col.,1979 (citado por Escobar, 2000).

Algunos de los antibióticos más utilizados en medios de cultivo para inhibir el desarrollo de bacterias son: oxitetraciclina, gentamicina-oxitetraciclina, clortetraciclina, cloramfenicol-clortetraciclina y cloramfenicol-kanamicina, King y col.,1979 (citado por Escobar, 2000).

El Agar DRBC (Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol) es un medio selectivo para el aislamiento y enumeración de mohos, pues posee la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano reduciendo además el crecimiento de mohos filamentosos como *Mucor* y *Rhizopus* sp., ya que restringe el tamaño de sus colonias lo cual favorece la enumeración de otros mohos de interés. Estas características se deben principalmente al Dicloran (2,6 Dicloro-4-nitroanilina) que está presente en el medio y al Rosa de Bengala Cloranfenicol, ambos componentes garantizan que no halla sobrecrecimiento de los mohos invasores. Estos componentes están presentes en el medio, ambos en las mismas cantidades (50% cada uno). Este medio tiene un pH de 5,6, no solo para inhibir el desarrollo bacteriano, sino para aumentar la efectividad del Dicloran. Por otra parte, la exposición a la luz puede incrementar marcadamente las propiedades inhibitorias del Rosa de Bengala y la

recuperación de los mohos puede verse seriamente perjudicada, King y col.,1979 (citado por Escobar, 2000).

3.- METODOS DE CONSERVACION DE LOS ALIMENTOS.

3.1.- Métodos de Conservación en Alimentos.

A medida que las sociedades se han desarrollado, los métodos de preparación y conservación de los alimentos se han especializado, haciendo posible la distribución de productos alimenticios de alta calidad a través de largas distancias. El objetivo principal de la aplicación de estos métodos es que los alimentos puedan extender su vida útil por largos periodos de tiempo manteniendo sus características de frescura, calidad e inocuidad. Algunos de los métodos de conservación empleados actualmente en la industria de alimentos son: 1) Procesos de preparación de conservas: enlatado, salado o curado y ahumado; 2) Procesos mediante remoción de calor: refrigeración, almacenamiento en atmósferas modificadas y controladas, congelación y liofilización; 3) Procesos calóricos empleando vapor o agua: escaldado, pasteurización, esterilización, evaporación y extrusión; 4) Procesos de deshidratación: horneado; 5) Procesos mediante la utilización de aceites calientes; 6) Tratamientos calóricos empleando radiación térmica: microondas y radiaciones infrarrojas; 7) Procesos modernos alternativos: pulsos de luz (PL), campos eléctricos pulsantes de alta intensidad (CEPAI), procesamiento por altas presiones, campos magnéticos oscilantes (CMO), calentamiento óhmico, arcos de descarga eléctrica, irradiaciones de luz ultravioleta, ultrasonido y rayos X.

Según Sancho-Madrid (2003), la conservación de alimentos se basa en tres principios fundamentales: retrasar o eliminar la actividad microbiana, retrasar la autodescomposición y la prevención de alteraciones ocasionadas por insectos, roedores o procesos mecánicos. En general, la conservación de alimentos consiste en la aplicación de ciencia basada en el conocimiento a través

de una variedad de tecnologías y procedimientos, usados con el fin de prevenir el deterioro y la alteración de los productos alimenticios, así como de extender su vida útil, mientras se asegura a los consumidores un producto libre de microorganismos patógenos (Sancho-Madrid, 2003).

3.2.- El Calor Como Método de Preservación en los Alimentos.

El procesamiento de alimentos involucra la combinación de diversos procedimientos que permiten extender su vida útil mediante técnicas de preservación que inhiben los cambios microbiológicos o bioquímicos y, al mismo tiempo, contribuyen a mejorar la calidad nutricional y sensorial de los alimentos. La secuencia de operaciones aplicadas en los alimentos es determinante en la obtención del producto final (Fellows, 1990).

En la industria se emplean diversos procesos para lograr la conservación de los alimentos. Dado que el calor tiene una influencia importante en el procesamiento de los mismos, las operaciones unitarias se pueden clasificar de acuerdo al medio empleado para su aplicación, (CYTED, 2003).

Entre los métodos más importantes empleados en el procesamiento de alimentos mediante el uso de calor se encuentran: A) Tratamientos calóricos empleando vapor o agua: escaldado, pasteurización, esterilización, evaporación y extrusión. B) Tratamientos calóricos de deshidratación: horneado. C) Tratamientos calóricos empleando aceites calientes. D) Tratamientos calóricos empleando radiación térmica: microondas y radiación infrarroja.

4.- LAS RADIACIONES.

4.1.- Tipos de Radiaciones y su Clasificación.

El fenómeno de radiación consiste en la propagación de energía en forma de ondas electromagnéticas o partículas subatómicas a través del vacío o de un medio material (Pozar, 1993).

Existen radiaciones de dos tipos: corpusculares y electromagnéticas. Las radiaciones corpusculares, son corrientes de partículas atómicas y subatómicas (partículas α , neutrones, etc.) que se mueven a gran velocidad en un medio o el vacío, con apreciable transporte de energía (rayos X) y que transfieren energía al chocar, este tipo de radiaciones se están usando experimentalmente para el tratamiento de algunos alimentos a nivel industrial. La radiación propagada en forma de ondas electromagnéticas (rayos UV, rayos gamma, microondas, etc.) se llama radiación electromagnética, esta altera la estructura interna de la materia y de este modo dispersa su energía, incluye ondas de radio, microondas, ondas de luz, y rayos gamma. Los rayos gamma y X son radiaciones ionizantes, es decir, producen la ionización de las moléculas, principalmente las de agua, de los materiales que las absorben, y destruyen los microorganismos sin elevar la temperatura de modo apreciable, debido a esto, la esterilización que se realiza de este modo recibe a veces el nombre de esterilización fría (Frazier, 1976).

La ionización es el proceso de eliminar los electrones de los átomos, dejando dos partículas cargadas eléctricamente (un electrón y un ion cargado positivamente). Estas partículas pueden causar daños en los tejidos vivos. La radiación no ionizante es aquella onda o partícula que no es capaz de arrancar electrones de la materia que irradia produciendo, como mucho, excitaciones electrónicas (Frazier, 1976).

Si la radiación transporta energía suficiente como para provocar ionización en el medio que atraviesa, se dice que es una radiación ionizante. En caso contrario se habla de radiación no ionizante. El carácter ionizante o no ionizante de la radiación es independiente de su naturaleza

corpúscular u ondulatoria, esta característica viene dada es por la frecuencia de la radiación, que determina la energía por fotón (Pozar, 1993).

Son radiaciones ionizantes los rayos X, rayos γ , partículas α , entre otras. Por otro lado, radiaciones como los rayos UV, las ondas de radio, TV o de telefonía móvil, y microondas, son algunos ejemplos de radiaciones no ionizantes (Pozar, 1993).

La radiación electromagnética es una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, que se propagan a través del espacio transportando energía de un lugar a otro. A diferencia de otros tipos de ondas, como las del sonido, que necesitan un medio material para propagarse, la radiación electromagnética se puede propagar en el vacío.

En física, una onda es una propagación de una perturbación de alguna propiedad de un medio, por ejemplo, densidad, presión, campo eléctrico o campo magnético, que se propaga a través del espacio transportando energía. El medio perturbado puede ser de naturaleza diversa como: aire, agua, metal o el vacío.

Considerando la radiación electromagnética como una onda, la longitud de onda λ y la frecuencia de oscilación ν están relacionadas por una constante, la velocidad de la luz en el medio (c en el vacío): $c = \lambda \times \nu$. A mayor longitud de onda menor frecuencia.

Las ondas electromagnéticas viajan aproximadamente a una velocidad de 300.000 Km por segundo, de acuerdo a su velocidad pueden ser agrupadas en rangos de frecuencia. Este ordenamiento es conocido como Espectro Electromagnético (Serway, 1998).

La velocidad de propagación de la radiación electromagnética en el vacío es c . La teoría electromagnética establece que:

$$c = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}}$$

siendo ϵ_0 y μ_0 la permitividad eléctrica y la permeabilidad magnética del vacío respectivamente (Serway, 1998).

En un medio material la permitividad eléctrica ϵ tiene un valor diferente a ϵ_0 . Lo mismo ocurre con la permeabilidad magnética μ y, por lo tanto, la velocidad de la luz en ese medio será diferente a c . La velocidad de propagación de la luz en medios diferentes al vacío es siempre inferior a c .

La permitividad eléctrica y la permeabilidad magnética de un medio diferente del vacío dependen, además de la naturaleza del medio, de la longitud de onda de la radiación. De esto se desprende que la velocidad de propagación de la radiación electromagnética en un medio depende también de la longitud de onda de dicha radiación.

La energía electromagnética en una particular longitud de onda λ (en el vacío) tiene una frecuencia f asociada y una energía de fotón E . Se relacionan en las siguientes ecuaciones: $c = f \lambda$, o lo que es lo mismo $\lambda = c / f$ y; $E = h f$, o lo que es lo mismo $E = hc / \lambda$. Donde $c = 299.792.458$ m/seg (velocidad de la luz) y h es la constante de Planck $h = 6,626069 \times 10^{-34}$ J/seg.

Por lo tanto, las ondas electromagnéticas de alta frecuencia tienen una longitud de onda corta y mucha energía mientras que las ondas de baja frecuencia tienen grandes longitudes de onda y poca energía (Serway, 1998).

Por lo general, las radiaciones electromagnéticas se clasifican en base a su longitud de onda en: ondas de radio, microondas, infrarrojos, luz visible, luz ultravioleta, rayos X y rayos gamma.

Atendiendo a su longitud de onda, la radiación electromagnética recibe diferentes nombres, en telecomunicaciones se clasifican las ondas mediante un convenio internacional de frecuencias en función del empleo al que están destinadas (Alfaro, 2004).

Tabla 2. Clasificación de las ondas electromagnéticas en las telecomunicaciones.

| Nombre | Abreviatura Inglesa | Banda (ITU) | Frecuencias | Longitud de Onda | Usos |
|-----------------------|---------------------|-------------|---------------------------|---------------------|--|
| ----- | ----- | ----- | Inferior a 3 Hz | > 100.000 Km | ----- |
| Extra Baja Frecuencia | ELF | 1 | 3 - 30 Hz | 100.000 – 10.000 Km | ----- |
| Súper Baja Frecuencia | SLF | 2 | 30 - 300 Hz | 10.000 – 1000 Km | ----- |
| Ultra Baja Frecuencia | ULF | 3 | 300 – 3000 Hz | 1000 – 100 Km | ----- |
| Muy Baja Frecuencia | VLF | 4 | 3 – 30 KHz | 100 – 10 Km | Radio de gran alcance comunicaciones militares |
| Baja Frecuencia | LF | 5 | 30 – 300 KHz | 10 – 1 Km | Radio y navegación aeronáutica y marina |
| Media Frecuencia | MF | 6 | 300 – 3000 KHz | 1 Km – 100 m | Radio de onda media (AM) |
| Alta Frecuencia | HF | 7 | 3 – 30 MHz | 100 – 10 m | Radio de onda corta |
| Muy Alta Frecuencia | VHF | 8 | 30 – 300 MHz | 10 – 1 m | TV y radio (FM) |
| Ultra Alta Frecuencia | UHF | 9 | 300 – 3000 MHz | 1 m – 100 mm | TV, radar, telefonía móvil |
| Super Alta Frecuencia | SHF | 10 | 3 - 30 GHz | 100 - 10 mm | Radars militares, comunicaciones vía satélite |
| Extra Alta Frecuencia | EHF | 11 | 30 - 300 GHz | 10 – 1 mm | Radar |
| ----- | ----- | ----- | Por encima de los 300 GHz | < 1 mm | ----- |

Las frecuencias entre 1 GHz y 300 GHz, son las conocidas como microondas. Estas frecuencias abarcan parte del rango de UHF (frecuencias ultra altas) y todo el rango de SHF (frecuencias súper altas) y EHF (frecuencias extremadamente altas). Estas ondas son utilizadas en numerosos sistemas y procesos (Alfaro, 2004).

Una de las aplicaciones más conocidas de las microondas es el horno de microondas doméstico o convencional, que usa un magnetrón para producir ondas a una frecuencia de aproximadamente 2,45 GHz. Estas ondas hacen vibrar o rotar las moléculas de agua, lo cual genera calor en los productos. Debido a que la mayor parte de los alimentos contienen un importante porcentaje de agua, pueden ser fácilmente calentados de esta manera.

5.- LAS MICROONDAS.

5.1.- Tratamiento Calórico en Alimentos Mediante la Utilización de Microondas.

Las microondas son ondas electromagnéticas de energía radiante (radiación electromagnética) con una longitud de onda que se encuentra ubicada dentro del espectro electromagnético, entre las ondas de radio y la luz infrarroja (las microondas tienen una longitud de onda corta). Las microondas se irradian desde una fuente de energía (estas generalmente son generadas por un magnetrón) y pueden ser absorbidas, transmitidas y reflejadas por una superficie o material (Dock y Floros, 2000).

La energía por microondas consiste en campos oscilantes eléctricos y magnéticos orientados perpendicularmente uno al otro. El campo eléctrico es la causa primaria del calentamiento, promoviendo la rotación de moléculas polares resultando en un calentamiento causado por fricción molecular (Alfaro, 2004).

Un sistema de microondas comercial, consiste principalmente de: un magnetrón, de un sistema de guía de ondas y de una cámara de tratamiento. El magnetrón es un diodo tubular electrónico, que genera las microondas convirtiendo el poder eléctrico a energía de microondas. El sistema de guía de ondas enfoca la energía directamente sobre un área pequeña, para una eficiencia óptima, y el alimento es colocado en la cámara de tratamiento para ser expuesto a la energía de las microondas, por un tiempo determinado (Dock y Floros, 2000).

El poder eléctrico es convertido en energía de microondas, la longitud de onda de estas radiaciones es mayor que la de la luz visible y tienen la propiedad de generar calor en los objetos irradiados. El contenido energético de estas radiaciones no es suficiente para producir ionización y su efecto letal sobre los microorganismos se debe al calor que se produce cuando las ondas son absorbidas. La radiación de las microondas puede penetrar en los tejidos varios centímetros, se transforma en calor al ser absorbida, y por ello los productos pueden calentarse rápidamente en toda su masa, evitando en gran parte, el inconveniente del excesivo tiempo requerido para la penetración del calor. El calentamiento por microondas, aparte de su rapidez, tiene la ventaja de que se puede controlar perfectamente, con lo cual es posible aplicar tratamientos térmicos mucho más precisos que con los tratamientos convencionales.

Pero este proceso tiene también inconvenientes, ya que su poder de penetración es limitado, la capacidad de las sustancias para absorber las radiaciones depende de ciertas propiedades eléctricas, sobre todo de la constante dieléctrica y del factor de pérdida. El calentamiento por microondas queda entonces restringido a los alimentos que contienen cantidades sustanciales de agua (la constante dieléctrica del agua es elevada) (CYTED, 2003).

La utilización de microondas industriales por diferentes tiempos y a diferentes niveles de energía, está siendo utilizada con mucho éxito, incluso para completar el horneado en la panificación. Este proceso presenta una alta eficiencia y prácticamente no produce cambios en el contenido de nutrientes, sin embargo, no suele ser frecuentemente utilizado por ser un proceso muy costoso.

Las operaciones o tratamientos de los productos en los cuales son más utilizadas las microondas son: la precocción de productos cárnicos y la descongelación de productos congelados, pero otras operaciones de procesamiento también están siendo aceptadas y utilizadas por la industria de alimentos. Algunos de los procesos en los cuales pueden ser usadas las microondas son:

la deshidratación, el blanching, la cocción, la pasteurización y la esterilización. Otros usos potenciales pueden ser: los horneados, la coagulación, los recubrimientos, la gelatinización, el tostado e inflado (CYTED, 2003).

Las desventajas más resaltantes que presentan las microondas son la inhabilidad de pardear los alimentos, el cocinado no uniforme de los productos de forma irregular y un excesivo secado en algunos alimentos como el pan. Es importante señalar que las microondas son una forma de energía y no una forma de calor (CYTED, 2003).

5.2.- Mecanismo de Transferencia de Calor Mediante el Uso de Microondas.

El mecanismo de transferencia de calor que se produce al usar las microondas, es muy diferente al de las tres formas comúnmente conocidas: conducción, convección y radiación (Alfaro, 2004).

El calentamiento por microondas involucra primariamente dos mecanismos dieléctrico e iónico. El agua en los alimentos es el componente primario responsable del calentamiento dieléctrico (movimiento molecular). Debido a su naturaleza dipolar, las moléculas de agua tratan de seguir el campo eléctrico asociado con la radiación electromagnética a medida que esta oscila a las altas frecuencias, tal oscilaciones en la molécula de agua produce calor. El segundo mecanismo importante del calentamiento por microondas es a través de la migración oscilatoria de iones en el alimento que genera calor bajo la influencia del campo eléctrico oscilatorio (Tang, 1998).

La tasa de generación de calor por unidad de volumen en el alimento (Q) durante el calentamiento por microondas puede ser expresado por la siguiente ecuación: $Q = 2\pi f \epsilon_0 \epsilon E^2$; donde E es la intensidad del campo eléctrico de la onda, f es la frecuencia de las microondas, ϵ_0 es la permitividad del espacio libre (constante física = $8,854 \times 10^{12}$ farad / metro), y ϵ es el factor de pérdida dieléctrica que representa la habilidad del material para absorber la onda y generar calor (Tang, 1998; CYTED, 2003; Alfaro, 2004).

La subsiguiente elevación de temperatura en el alimento depende de la duración del calentamiento (tiempo de exposición a las microondas), la ubicación del alimento dentro de la cámara, la geometría del producto, la transferencia de calor convectivo en la superficie del mismo y el grado de evaporación dentro del alimento y en su superficie (Tang, 1998).

El factor de pérdida es una medida de la capacidad del material para disipar la energía de microondas como calor. El conocimiento del factor de pérdida es esencial para considerar el uso de las microondas en cualquier proceso particular. La constante dieléctrica (capacidad de un material para absorber energía) y el factor de pérdida (capacidad del material para disipar en forma de calor la energía absorbida) se ven afectados por la frecuencia, la temperatura, la densidad del material, el contenido de agua, el contenido de sal, el estado del alimento (congelado o fresco), y el tamaño del producto.

Los sistemas de calentamiento por microondas han sido preparados tanto para el tratamiento de productos en el interior de sus envases como para sistemas de flujo continuo. La mayoría de los sistemas europeos utilizan la frecuencia de 2450 MHz y combinan los efectos del calentamiento por microondas y las técnicas de calentamiento convencional. Así, aire caliente o vapor se combinan con microondas para producir una rápida elevación de la temperatura y una distribución controlada de la misma en la superficie y por la totalidad del producto. Los sistemas de tratamiento en el interior del envase suelen consistir en un túnel por el que pasan los envases llenos y cerrados antes de someterlos a la acción de los microondas para que el producto alcance la temperatura requerida de tratamiento. La mayoría de estos sistemas se orientan a la obtención de productos pasteurizados que puedan precisar una distribución y un almacenamiento en ambientes refrigerados. Varias empresas siguen desarrollando procesos de esterilización por microondas de productos envasados (CYTED, 2003).

Dentro de las frecuencias de la banda internacional disponibles para la aplicación industrial solo las frecuencias de 915 y 2450 MHz, son de importancia para aplicación de procesos de calentamiento por microondas, especialmente para el procesamiento de productos alimenticios (Alfaro, 2004).

En un estudio realizado por Manzollilo, 2002 (citado por Alfaro, 2004) sobre el comportamiento de algunas sustancias frente a la aplicación de las microondas, se determinó que el hielo prácticamente no sufre calentamiento, esto debido a que es una sustancia cristalina y ordenada. El agua si es rápidamente calentada por su mecanismo de rotación dipolar, y las soluciones acuosas de NaCl son más rápidamente calentadas que el agua pura. A mayor concentración de NaCl en la solución la misma se calienta más rápidamente.

Barrett y col., 1992 (citado por Alfaro, 2004) evaluaron la calidad física y sensorial de huevos deshidratados al ser utilizados métodos convencionales y de radiación de microondas. La frecuencia utilizada fue 2450 MHz y la capacidad del equipo fue de 1,2 Kg. La temperatura no excedió a la temperatura ambiental y el tiempo requerido para la deshidratación fue de aproximadamente 7 horas con el uso de las microondas, mientras que por el método convencional se alcanzaron temperaturas de 82°C y el tiempo requerido fue de 15 horas. En este estudio se obtuvo que la textura de los huevos deshidratados es ampliamente mejorada al usar el método con microondas, el cual mantuvo las muestras a bajas temperaturas y permitió la reducción de los tiempos de deshidratación al compararse con un deshidratador convencional. Se encontró una reducción en los procesos deteriorativos del producto, oscurecimientos y en particular la asociación proteína-carbohidratos. Las bajas temperaturas de deshidratación asociadas a las radiaciones de microondas produjeron menos cambios estructurales en la proteína del huevo que con las altas temperaturas de deshidratación y largos tiempos usados durante la deshidratación convencional.

Conkerton y col., 1994 (citado por Alfaro, 2004) realizaron un estudio con muestras de semillas de algodón (*Gossypium sp.*) las cuales fueron expuestas a las radiaciones de microondas a 45 kW, 2450 MHz, durante 4 minutos y a una temperatura de 94°C. Este tratamiento causó un 20% de reducción de la humedad en las semillas. Al finalizar el tratamiento con microondas la evaluación demostró que no se encontró diferencias en el contenido total o soluble de proteínas, o en el contenido o color del aceite extraído, cuando fueron comparados los resultados con los realizados a semillas que no fueron tratadas con las microondas.

Jamshidi y col., 2010, estudiaron el efecto de la radiación de las microondas en muestras de carne inoculadas con *E. coli* O157: H7. La evaluación la realizaron a diferentes tiempos de exposición de los trozos de carne a las microondas (10, 20, 30, 40 y 50 segundos), el cual era doméstico. Ellos concluyeron que la radiación de las microondas con 70 °C elimina la contaminación con *E. coli* O157: H7 en la superficie de las rebanadas de carne.

Woo y col., 2000, estudiaron el efecto de la radiación de microondas sobre suspensiones de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, obteniendo una reducción dramática de los recuentos viables así como aumentos en la cantidad de ADN y proteína liberada de las células de acuerdo con la elevación de la temperatura. Sin embargo; no observaron ninguna reducción significativa de la densidad celular creyendo que se debió al hecho de que la mayoría de las células bacterianas inactivadas por radiación de microondas se mantuvieron no lisadas. Realizaron también estudios de microscopía electrónica de barrido lo que reveló graves daños en la superficie de la mayoría de las células de *E. coli*, pero no hubo cambio significativo en las células de *B. subtilis*.

Gedikli y col., 2008, evaluaron el efecto de las microondas sobre *E. coli*, *B. cereus* y *S. aureus*. Ellos compararon diferentes grados de inactivación por varios tiempos de exposición, la cantidad inicial de las células y el poder de las microondas. Ellos encontraron que la máxima eficiencia de las microondas fue a los 60 segundos del tiempo de exposición, con una concentración

inicial de 1×10^8 células bacterianas de *E. coli* con una potencia de 900W. Los datos experimentales mostraron que las microondas producen un efecto letal sobre las bacterias evaluadas debido al calor generado durante la exposición a las microondas.

Cabe destacar, que no se encontraron estudios sobre el efecto de la irradiación de las microondas en la incidencia de mohos en alimentos.

Es importante mencionar que en los hornos de microondas domésticos (multimodo), la distribución de las microondas en su interior no se realiza de forma homogénea, es decir que las microondas no son emitidas directamente hacia el producto. Los equipos de microondas con fines de investigación (mono modo) emiten las microondas específicamente a un lugar determinado, por lo cual el producto sometido a las microondas necesita un menor tiempo de exposición y el calentamiento que se produce en el mismo es más homogéneo. Es por esto que los equipos de microondas con fines de investigación son más eficientes desde el punto de vista energético, y garantizan una mayor reproductibilidad en los experimentos, además de que los hornos de microondas domésticos no son fabricados para trabajar en investigaciones científicas (Alfaro, 2004).

IV. MATERIALES Y METODOS.

1.- Toma de Muestras.

La mayoría de las muestras de café verde analizadas (6 de las muestras) fueron obtenidas en una industria torrefactora de café localizada en el área metropolitana de Caracas (en la zona industrial de la Yaguara). Dichas muestras provienen de distintas regiones productoras del país como: Rio Claro (Edo. Lara), Machiques (Edo. Zulia), Biscucuy (Edo. Portuguesa), Sanare (Edo. Lara), Bocono (Edo. Trujillo) y Guárico (Edo. Lara). La séptima muestra de café verde fue obtenida directamente en una finca de un pequeño productor independiente, (La Alameda), ubicada en los Teques - Las Colinas, Vía Lagunetica - Sector La Alcabala, del Edo. Miranda.

Las muestras a nivel industrial se obtuvieron tomando una cantidad aproximada de 800g de café verde por saco muestreado, utilizándose un calador de granos según (COVENIN 383:1995).

Tabla 3. Plan de muestreo para el café verde.

| N° de Sacos | N° de Sacos Muestreados |
|--------------------|--------------------------------|
| Hasta 10 | Cada Saco |
| 11 - 100 | 10 |
| Hasta 250 | 20 |

Los granos obtenidos fueron de la especie *Coffea arabica* (café arábigo) o como se le conoce en el país granos de café criollo.

Una vez recolectadas todas las muestras, estas fueron trasladadas al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (I.C.T.A) para la realización de los respectivos análisis.

2.- Análisis Proximal de los Granos de Café Verde.

Se procedió a realizar el análisis proximal a las diversas muestras de granos de café verde a fin de evaluar su composición química al momento del análisis microbiológico. La determinación de humedad del café verde se realizó de acuerdo a la Norma Venezolana COVENIN 2128-84. Determinación de la pérdida de masa a 105 °C.

También se realizaron las determinaciones de cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda, para caracterizar las distintas muestras de granos de café verde con los que se trabajó. Para la realización de estos análisis se siguieron las normas aplicadas para los granos de café tostado (COVENIN 46:1994), ya que este tipo de determinaciones no suelen realizarse a los granos de café verde a nivel industrial o comercial. También se revisaron y utilizaron algunos Métodos Oficiales para el Análisis de la Asociación Oficial de Análisis Químicos (Official Methods of Analysis of the Association Official Analysis Chemists (AOAC)).

Tabla 4. Algunas de las determinaciones realizadas a los granos de café verde.

| DETERMINACION | METODO |
|----------------------|---|
| Humedad | COVENIN 2128-84 |
| Cenizas | A.O.A.C Official Method N° 972.15, 2000 |
| Proteína Cruda | A.O.A.C Official Method N° 955.04, 2000 |
| Grasa Cruda | A.O.A.C Official Method N° 963.15, 2000 |
| Fibra Cruda | A.O.A.C Official Method N° 930.20, 2000 |

El contenido de los carbohidratos se calculó restando del 100% del resto de los macronutrientes anteriormente señalados.

3.- Caracterización Físicoquímica de los Granos de Café Verde.

El pH y la acidez son parámetros muy importantes ya que están íntimamente relacionados con la conservación y almacenamiento de los alimentos, así como también en el control de procesos naturales e industriales. Además de esto en los granos de café, el valor del pH determina ciertas características de sabor y calidad, lo que permite una clasificación de los granos y del producto final que se puede llegar a obtener.

Tabla 5. Análisis físicoquímicos realizados a los granos de café verde.

| DETERMINACION | METODO |
|------------------------|---|
| pH | A.O.A.C Official Method N° 970.21, 1990 |
| Acidez Total Titulable | A.O.A.C Official Method N° 942.15, 1990 |

4.- Determinación del Porcentaje de Granos Defectuosos.

Se colocaron 300 gramos de cada muestra en una bandeja de fondo claro y se seleccionaron manualmente aquellos granos defectuosos (granos negros, granos partidos, granos inmaduros, granos amarillos y materia extraña). El porcentaje de cada uno de estos defectos se determinó mediante la relación porcentual de peso entre los granos defectuosos y el peso total de muestra (COVENIN 609-1994).

5.- Determinación de la Actividad de Agua.

La actividad de agua (a_w) de las muestras se determinó por triplicado a cada una de ellas utilizando un equipo DECAGON CX-1 AQUA LAB. El cual es un instrumento psicrométrico que utiliza la técnica de enfriamiento de un espejo por efecto Peltier.

6.- Clasificación de los Granos de Café Verde.

La clasificación de los granos fue dada por la planta procesadora que suministró las muestras de café verde. También se llevó a cabo mediante el uso de la Tabla 6, (Casanova, 2004).

Tabla 6. Características para determinar la clasificación o tipo de grano de café verde.

| GRADO | DESCRIPCIÓN |
|---|--|
| <p>1 ó A Bueno "A" ó Bueno Fino</p> | <p>Generalmente compuesto de grano de café lavado de cosecha nueva, sumamente bien desarrollado y preparado. Café mantenido en buena forma, homogéneo, estrictamente producido en zonas altas, de olor intensamente fresco y color homogéneo. Bueno a excelente en calidad de taza, cumpliendo con todos los requisitos específicos de sabor. Humedad: 10%; Defectos: Máximo número de defectos 15%.</p> |
| <p>2 ó B Bueno "B" (BB)</p> | <p>Generalmente compuesto de grano de café lavado de cosecha actual. Café de altura, de olor fresco y color homogéneo. Buena calidad de taza. Sin embargo no cumple con todos los requisitos de un café de grado 1. Ausencia de características típicas, incapaz de caracterizar mezclas. Humedad: de 10% a 12,5%; Defectos: Máximo número de defectos 23%.</p> |
| <p>3 ó C Bueno "C" (BC)</p> | <p>Generalmente compuesto de grano de café lavado y/o natural de periodo de la cosecha actual. Calidad mediana de taza. Café cuya calidad original hasta cierto punto ya ha empezado a deteriorarse, por ejemplo no siendo completamente fresco y/o bien preparado. Café que hasta cierto punto le falta característica de sabor básico (debido al tiempo de la cosecha o café de zona baja) sin llegar a ser claramente defectuoso. Humedad: de 10% a 12,5%; Defectos: Máximo número de defectos 30%.</p> |
| <p>4 ó D Bueno "D" (BD)</p> | <p>Generalmente todos los cafés lavados y naturales que han sido afectados por el deterioro de envejecimiento (cosecha vieja/pasada) o deterioro por mala preparación, almacenamiento inadecuado y/o deficiencias en el transporte, mostrando sabor a madera o sabores similares no deseados a una magnitud moderada. Humedad: Máximo 13%; Defectos: Máximo número de defectos 35%.</p> |
| <p>5 ó E (Deficiente)</p> | <p>Generalmente cafés lavados y naturales que exhiben defectos de sabor como por ejemplo sabor fermentado, mohoso, terroso, fenólico, sumamente viejo, etc. Cafés que exceden la máxima cantidad de defectos de taza permitida según las especificaciones. Humedad: Máximo 13%; Defectos: Máximo número de defectos 40%.</p> |

7.- Determinación del Contaje Total de Mohos e Identificación.

Se analizaron 7 muestras de café verde venezolano, utilizando la técnica de siembra por superficie para determinar el contaje total de mohos, en placas de Petri con agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC).

A partir de cada una de las muestras analizadas, se procedió a pesar asépticamente 10 gramos de muestra a la cual se le añadió 90 mL de agua peptonada al 0,1 % lo que constituye la dilución 1/10. Adicionalmente se prepararon las diluciones seriadas pertinentes. De cada una de las diluciones se tomaron alícuotas por triplicado de 0,1 mL y se inocularon por superficie en placas de Petri con agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), el cual es un medio selectivo para mohos y levaduras, inhibe el crecimiento bacteriano, limita el crecimiento de hongos invasores como *Rhizopus* y *Mucor*, hace que el medio pueda soportar el crecimiento de las especies que no pueden crecer a bajo pH como en el agar de Patata Dextrosa (PDA) y restringe el tamaño de las colonias haciendo que el contaje de los mohos se facilite.

Posteriormente, las placas fueron incubadas en un cuarto oscuro, a temperatura ambiente de 5 a 7 días, transcurrido el tiempo se procedió al contaje de los mohos y los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g). Para la identificación de las especies más abundantes se procedió a aislarlas en agar extracto de malta (EMA) y en agar Czapek, para su posterior identificación.

8.- Determinación del Grado de Infestación o Colonización de los Granos de Café.

Se tomó una porción de 20 g de cada una de las muestras de café verde y se colocó en un recipiente que contenía hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,4% por 2 min. Luego se procedió a escurrir el NaClO y los granos fueron sometidos a dos lavados sucesivos con agua destilada esterilizada. Posteriormente los granos de café se lavaron con etanol al 80%, durante 3 min y luego se procedió a lavar nuevamente los granos de café con agua destilada esterilizada tres

veces. Los granos fueron escurridos y secados con servilletas estériles. Posteriormente con una pinza estéril, se colocaron 50 granos de café verde en placas con agar DRBC (5 granos por placa, 10 placas en total), estas placas se incubaron en un cuarto oscuro, a temperatura ambiente, de 5 a 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a determinar el grado de infestación en porcentaje, según la cantidad de granos infestados obtenida para cada una de las muestras.

9.- Identificación de los Mohos Presentes en los Granos de Café Verde.

A partir de las colonias de mohos obtenidas en las placas con agar DRBC, se aislaron en placas de Petri con agar Extracto de Malta (EMA) y agar Czapek las principales especies de mohos encontradas, en las muestras de granos de café, para su posterior observación e identificación macroscópica y microscópica, mediante la utilización de las claves taxonómicas correspondientes. Esto se realizó de la siguiente manera: con una aguja flameada, se tomó una porción de la colonia del moho de interés ubicada en la placa con DRBC realizando una punción sobre la misma, y luego esta se llevó a una placa con EMA o Czapek, realizando tres punciones sobre la placa de Petri de forma invertida. Estas placas se dejaron incubando durante 7 a 10 días, en un cuarto oscuro, a temperatura ambiente sin invertir, para luego transcurrido el tiempo poder observar con mayor claridad las características macroscópicas del moho de interés

Luego de los aislamientos realizados en las placas con EMA y agar Czapek, se tomaron pequeñas muestras para preparar también algunas láminas con cultivos de los mohos obtenidos de las muestras de los granos de café verde, y poder observarlos al microscopio e identificarlos microscópicamente mediante la utilización de las claves taxonómicas de Samson y col.,(1995). Esto se realizó de la siguiente manera: con dos agujas flameadas, se tomó una porción del moho de interés y se colocó en una lámina portaobjeto donde se colocó previamente una gota de solución de azul de algodón, luego se agregaron 1 o 2 gotas de alcohol y se colocó el cubre objeto presionando muy levemente sobre la preparación de manera de no romper las estructuras esenciales para la

identificación. Posteriormente se llevó el montaje realizado al microscopio y se procedió a la observación e identificación del moho de interés.

10.- Evaluación de la Capacidad Toxigénica de las Cepas Fúngicas Aisladas.

Comúnmente las micotoxinas se extraen con solventes orgánicos entre los que se destacan el cloroformo, diclorometano, acetona, metanol, etc. Frecuentemente han dado muy buenos resultados ciertas mezclas de algunos solventes con pequeñas cantidades de agua ya que aunque la solubilidad de muchas micotoxinas en el agua es muy pequeña, los disolventes acuosos pueden penetrar los tejidos hidrófilos lo cual conduce a una extracción muy eficiente de las mismas (Raybaudi, 1999).

La determinación de micotoxinas se realizó utilizando una de las metodologías propuestas por Samson y col., (1995), la de cromatografía en capa fina (TLC). Además de la cromatografía en capa fina (TLC) están la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y los ensayos inmunoquímicos. Estos dos últimos son métodos mucho más exactos y de mayor sensibilidad comparados con la cromatografía de capa fina (TLC).

Previamente se clasificaron taxonómicamente las cepas de mohos aisladas de los granos de café verde. Posteriormente, se escogieron aquellas colonias de mohos que presuntivamente pudieran ser micotoxigénicos.

Como ya se dijo anteriormente, en una de las metodologías propuestas por Samson y col., (1995) se lleva a cabo un proceso de cromatografía en capa fina (TLC) para la determinación de micotoxinas. Esta detección está basada en las propiedades de coloración y fluorescencia de las micotoxinas. La cuantificación puede ser realizada por varios métodos, siendo uno de los más comunes la estimación visual. Esto involucra la comparación de estándares de micotoxinas de

valores Rf conocidos con el color e intensidad de fluorescencia de la muestra sobre un rango de concentraciones del estándar.

Este método es utilizado principalmente de manera cualitativa en base a la comparación con soluciones de estándares de micotoxinas de concentraciones conocidas. El proceso se realizó de la siguiente manera: A partir de las cepas de mohos micotoxigénicos aislados de los granos de café verde (*Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus niger*), en las placas con agar Extracto de Malta (EMA) y agar Czapek e incubadas durante 7 a 10 días, se agregó sobre estas colonias una o dos gotas de solución de cloroformo-metanol (2:1). Posteriormente se dejó secar la colonia y a partir de esta se tomó con ayuda de un asa o aguja, una porción miceliar del centro de la misma y se transfirió hacia un punto de la placa de sílica gel, el cual no excedió los 8mm de diámetro. A partir de este punto se procedió a realizar una cromatografía en capa fina.

La placa con el punto miceliar ya colocado, se pasó a un tanque cromatográfico, el cual contenía un solvente característico, el cual fue TAM (tolueno/acetona/metanol, 5:3:2). La placa fue colocada dentro del tanque en posición vertical con el extremo inferior (donde se encuentran las manchas o puntos de las muestras colocadas) inmerso en el solvente. El solvente (fase móvil) migra a través de la capa absorbente (fase estacionaria) por capilaridad efectuando una separación en manchas individuales perpendicularmente a la línea base. Después de dejar migrar el solvente hasta una determinada distancia (unos 16 cm aproximadamente) y transcurrido cierto tiempo (45 min), la placa fue removida y el solvente fue evaporado a sequedad.

El desarrollo de la cromatografía duró aproximadamente 45 minutos. Luego la placa de sílica gel, fue retirada del tanque cromatográfico para la evaporación del solvente y se calcularon los Rf de cada una de las manchas. Después se colocó la placa de sílica gel para ser observada: bajo la luz ultravioleta de onda larga a 366nm. Posteriormente la placa debe ser colocada en un tanque cromatográfico con vapores de amoníaco durante 5 min, tiempo después del cual se observa

nuevamente bajo luz ultravioleta para observar más claramente la presencia o no de fluorescencia azul-verdosa característica de OTA y se determina su Rf. Luego a partir de valores estandarizados de Rf y del color característico observado bajo la luz UV, se determina si el moho es o no productor de ocratoxina A. Aun que en este caso la placa no se colocó posteriormente en vapores de amonio se logro observar claramente la fluorescencia azul-verdosa en las manchas de las corridas realizadas.

11.- Metodología para la Aplicación del Tratamiento de Radiaciones de Microondas.

El equipo de microondas que fue usado en esta investigación, se encuentra en el Laboratorio de Desarrollo de Nuevas Tecnologías, que forma parte del I.C.T.A. Dicho equipo (Figura 18) es un microondas modo modal de marca comercial SAIREM (empresa francesa que se dedica a la fabricación de equipos de microondas y de radio frecuencias) modelo DO 3030 y numero de serie 84.28.06. Este microondas construido en el 2006 con fines académicos y de investigación se utilizó para evaluar el efecto que producen las radiaciones de microondas sobre la incidencia de los mohos que se encuentran presentes en los granos de café verde.

Los equipos de microondas del tipo mono modo o monomodal son aquellos en los cuales las microondas son irradiadas de forma continua y directa sobre la muestra, esto permite que los estudios que se realicen con estos equipos, puedan ser más controlados, menos variables y más reproducibles, además que los tiempos de exposiciones se reducen. Estos equipos poseen una guía de ondas que dirigen las microondas directamente hacia el producto. Los equipos de microondas multi modo o multimodales son aquellos en los cuales las microondas no son irradiadas de forma continua, ni directa sobre la muestra, sino que la microonda es generada para posteriormente chocar y rebotar dentro de una cámara o cavidad y luego llegar al producto en cuestión. Estos equipos no poseen la guía de ondas y por lo general presentan un disco giratorio para colocar las muestras (Los equipos de microondas caseros son del tipo multimodal) (Alfaro, 2004).



Figura 18. Equipo de microondas SAIREM utilizado.

El sistema generador de microondas que se usó en esta investigación, es un equipo de microondas que opera con una frecuencia de emisión de 2450 MHz y una potencia de salida que va de 0 a 2 kW. Tales parámetros (frecuencia y potencia) son típicos de los equipos microondas.

Se realizaron varias pruebas preliminares y se decidió trabajar con una sola potencia (0,05 kW) y varios tiempos de exposición (1min, 3min, 5min, 7min, 10min), ya que a potencias mayores los granos de café verde se tostaban o quemaban en tan solo unos pocos segundos.

De cada una de las muestras de café verde se tomaron 50 g (para cada uno de los tratamientos), los cuales se colocaban en tubos de ensayos para introducirlos en el equipo y poder aplicar el tratamiento de microondas al tiempo de exposición correspondiente.

12.- Aplicación de Pruebas de Viabilidad.

A cada una de las muestras de granos de café verde (tratadas y no tratadas con el equipo de microondas), se le realizaron varias diluciones seriadas, posteriormente, cada una de las muestras se

cultivaron en placas con agar DRBC. Luego las placas se incubaron durante 5 a 7 días a temperatura ambiente, en oscuridad y sin invertir. Finalizado el periodo de incubación se contó, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas de agar y se determinó el título correspondiente. Luego se realizaron comparaciones entre los valores de unidades formadoras de colonias y los títulos obtenidos para cada una de las muestras antes y después de la exposición a las microondas para cada uno de los distintos tiempos aplicados. La diferencia en los valores de los títulos obtenidos antes y después de los tratamientos de radiación de microondas en las muestras, así como la cantidad de unidades de colonias obtenidas, determina el efecto inhibitorio de las microondas, sobre la incidencia de los mohos en las muestras de granos de café verde. El porcentaje de granos infestados también fue determinado antes y después del tratamiento.

13.- Análisis de los Datos Obtenidos.

Todos los datos obtenidos de los experimentos realizados durante este estudio, fueron procesados utilizando un programa estadístico de datos llamado Statgraphics Centurion 16.1. Se realizó una prueba de t de Students para verificar la existencia de diferencias significativas entre los contajes de mohos obtenidos en las muestras analizadas, igualmente se realizó para los porcentajes de infestación obtenidos. Se calcularon las distintas desviaciones estándar en los experimentos realizados. En cuanto al experimento de la aplicación de microondas a diferentes tiempos a las distintas muestras, se realizó un análisis de varianza para observar si existían diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el efecto de los distintos tiempos de exposición de los granos de café verde a las radiaciones de microondas, sobre la incidencia de los mohos presentes en las distintas muestras. También se aplicó una prueba ANOVA para observar la existencia de posibles diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los parámetros fisicoquímicos determinados de las distintas muestras.

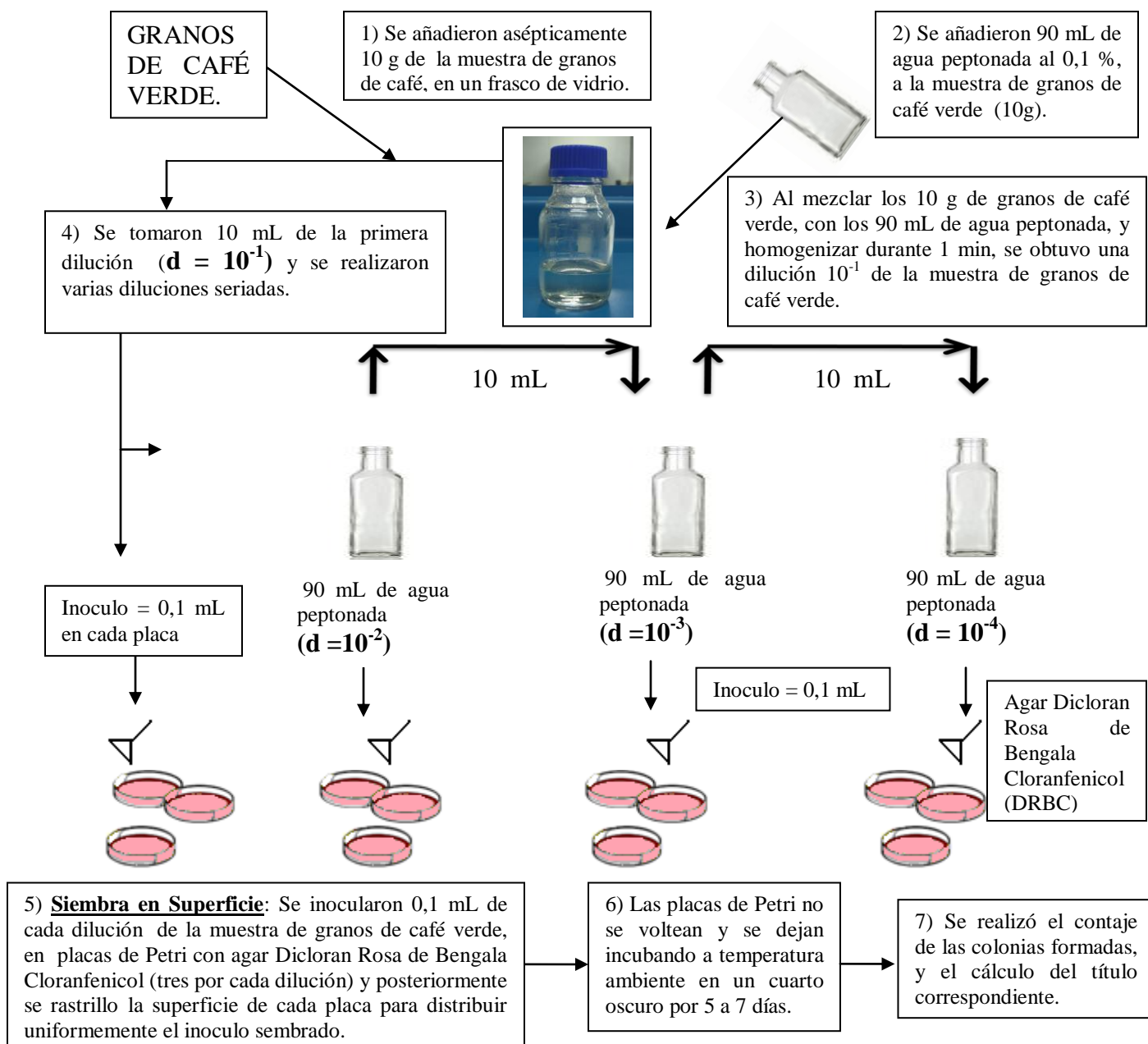


Figura 19. Esquema usado para la determinación de mohos, en granos de café verde.

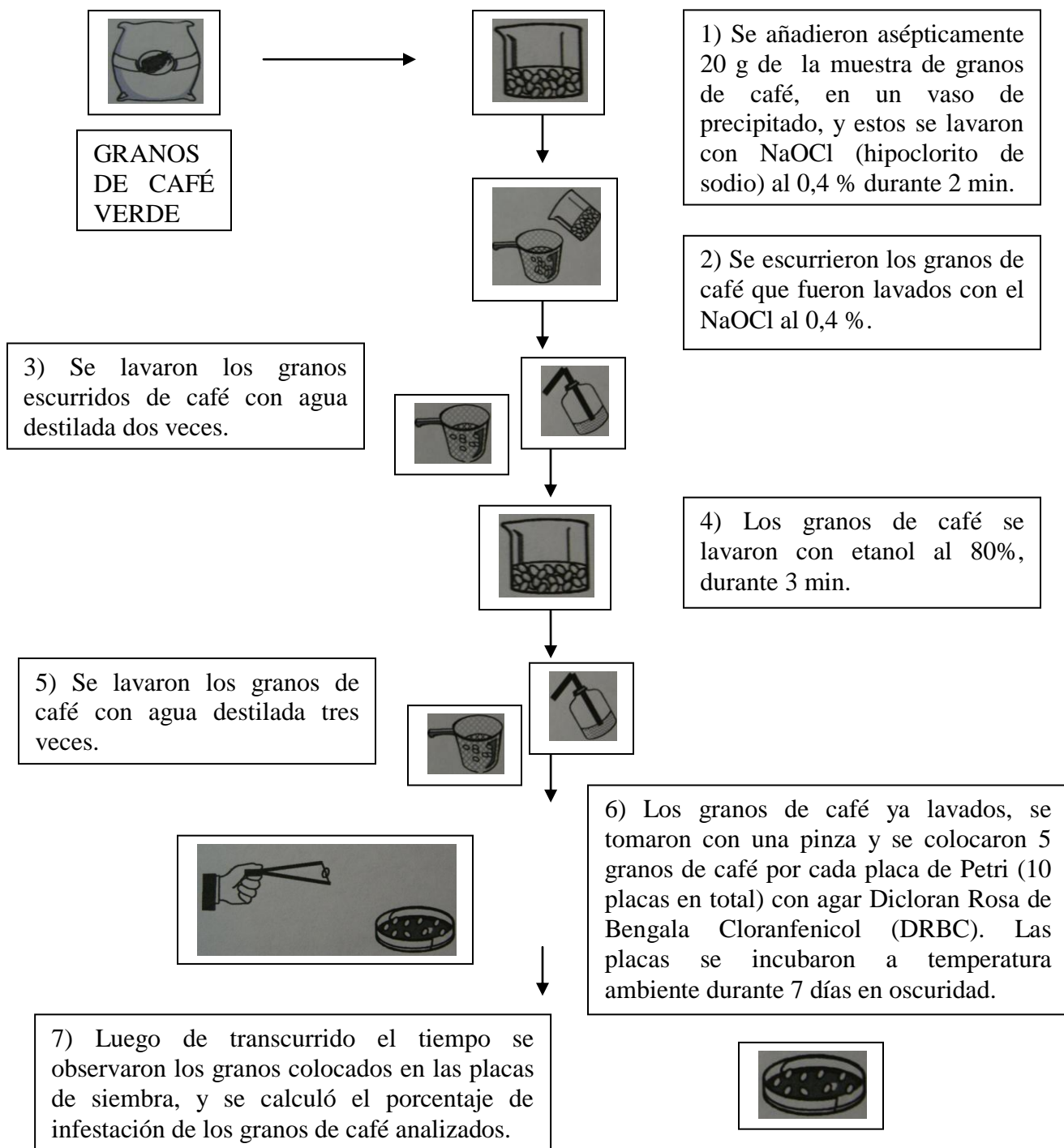


Figura 20. Esquema del procedimiento usado para la determinación de la microflora interna de mohos en granos de café verde.

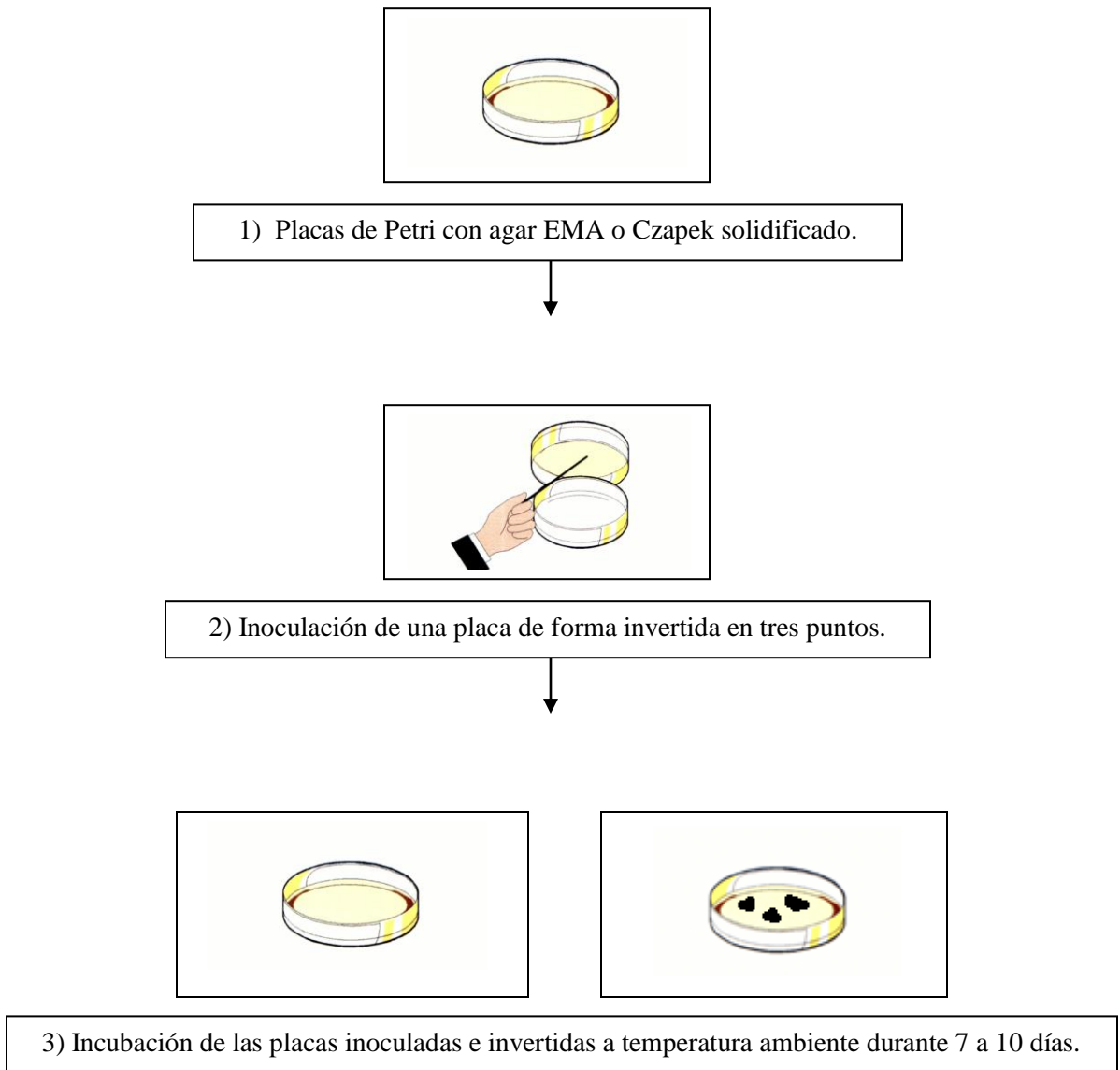


Figura 21. Metodología utilizada en el laboratorio para la identificación de las cepas de los mohos aislados de las muestras de granos de café verde.

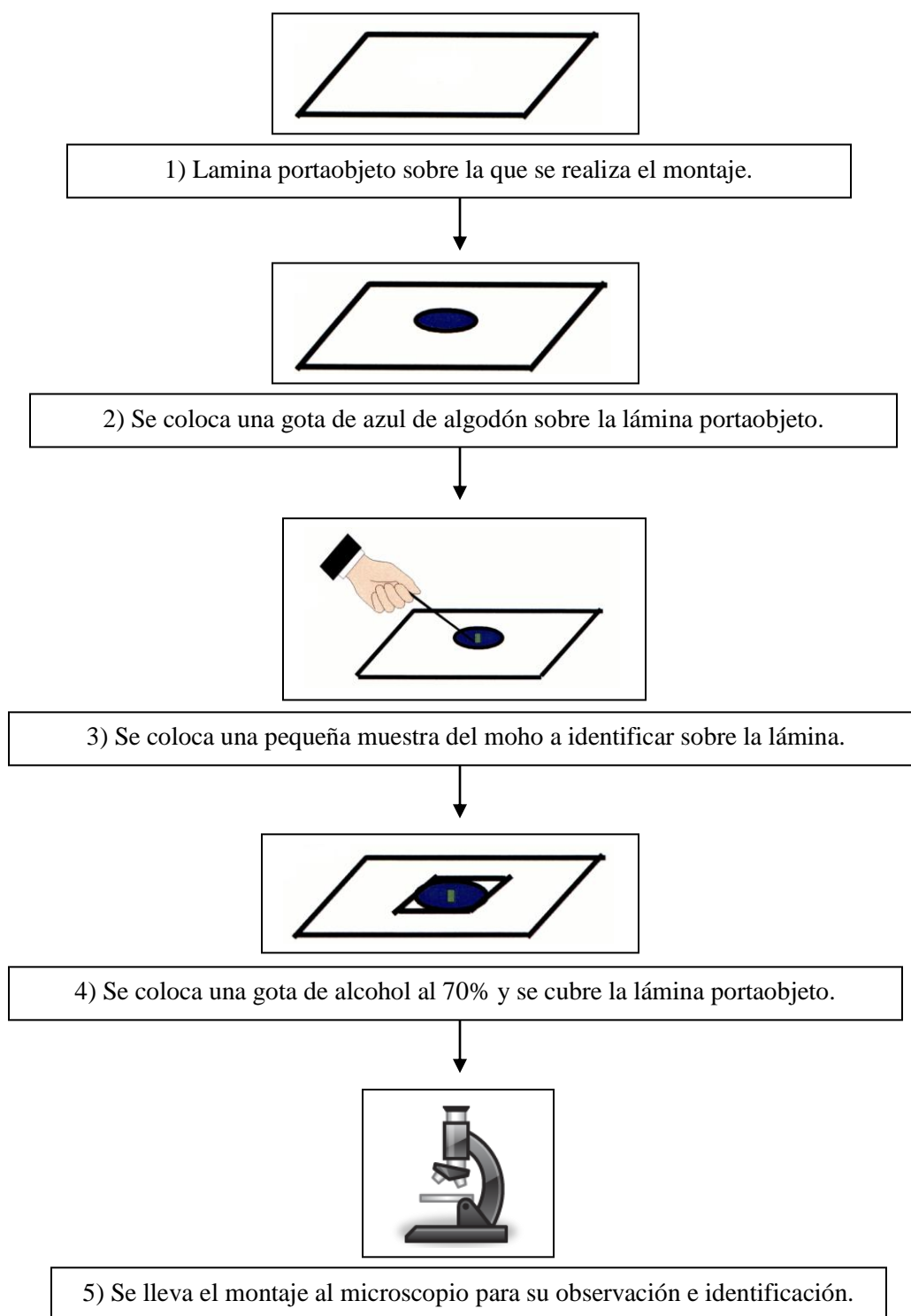


Figura 22. Metodología utilizada en el laboratorio para la identificación microscópica de las cepas de los mohos aislados de las muestras de café verde.

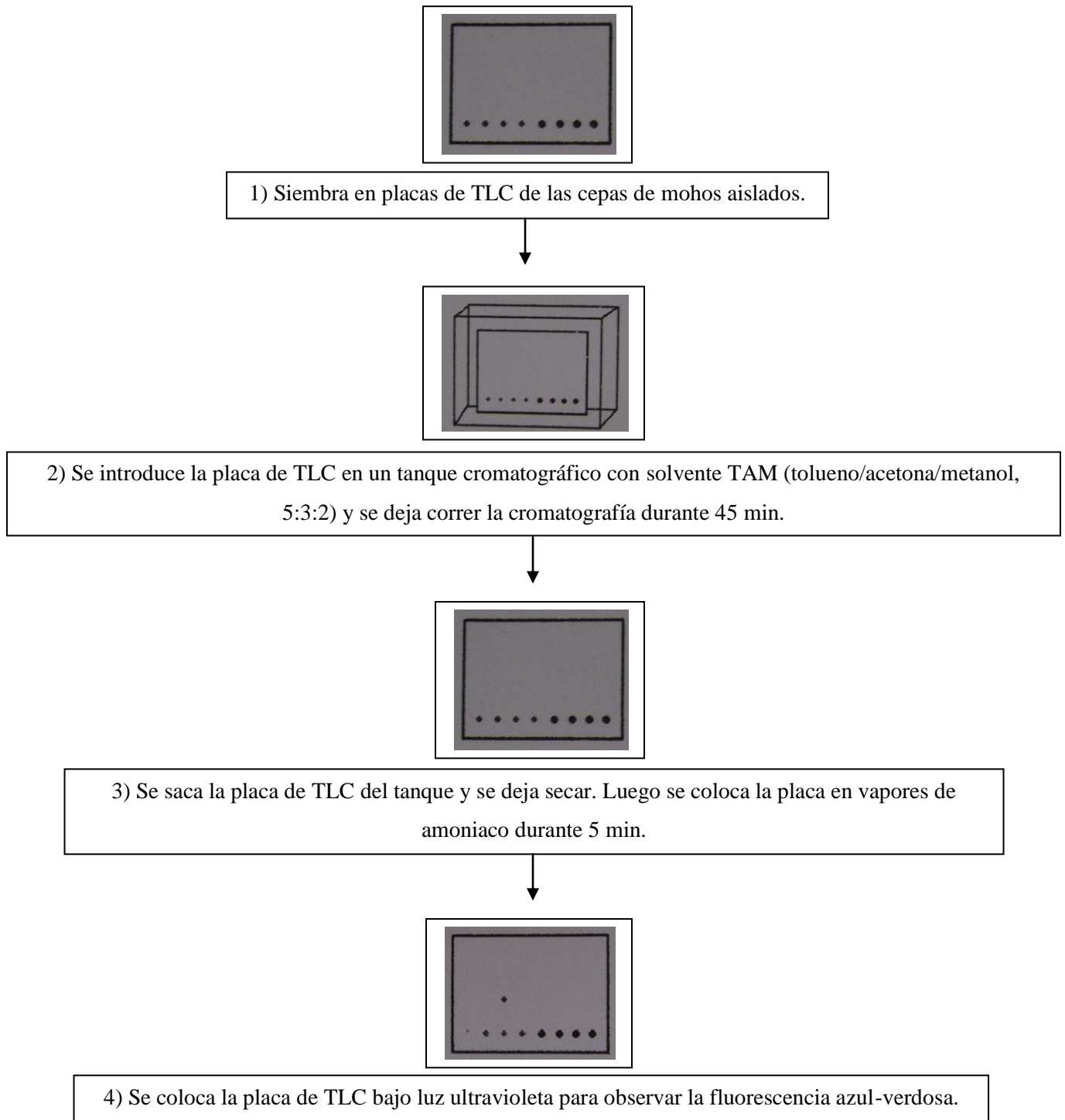


Figura 23. Metodología utilizada en el laboratorio para la evaluación de la capacidad micotoxigénica de las cepas de mohos aisladas de las muestras de granos de café verde.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

1.- COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL.

1.1.-Analisis Proximal de los Granos de Café Verde.

A continuación en la Tabla 7, se muestran los resultados del análisis proximal realizado a las siete muestras de granos de café verde, antes de ser sometidas al tratamiento de microondas.

Tabla 7. Composición química proximal (% en base seca) de los granos de café verde.

| Procedencia de las Muestras de Granos de Café | Análisis Proximal | | | | | |
|---|--------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | % Humedad | % Proteína Cruda (B.S) | % Grasa Cruda (B.S) | % Fibra Cruda (B.S) | % Carbohidratos (B.S) | % Cenizas (B.S) |
| BISCUCUY (Edo. Portuguesa) | 10,53 ^(a,b) | 14,36 ^(b) | 15,05 ^(a) | 18,46 ^(b) | 46,87 ^(c) | 5,25 ^(a,b) |
| BOCONO (Edo. Trujillo) | 10,83 ^(a,b,c) | 15,29 ^(d) | 16,64 ^(c) | 18,24 ^(b) | 45,03 ^(b) | 4,81 ^(a) |
| GUARICO (Edo. Lara) | 10,4 ^(a) | 14,54 ^(b,c) | 15,74 ^(b) | 19,24 ^(c) | 45,13 ^(b) | 5,35 ^(a,b) |
| RIO CLARO (Edo. Lara) | 11,2 ^(c) | 15,65 ^(e) | 14,96 ^(a) | 16,33 ^(a) | 44,95 ^(b) | 7,1 ^(c) |
| SANARE (Edo. Lara) | 11,17 ^(c) | 14,55 ^(c) | 15,99 ^(b) | 18,45 ^(b) | 41,2 ^(a) | 8,81 ^(d) |
| LOS TEQUES (Edo. Miranda) | 10,98 ^(b,c) | 13,75 ^(a) | 14,99 ^(a) | 18,34 ^(b) | 47,91 ^(c) | 5,01 ^(a) |
| MACHIQUES (Edo. Zulia) | 10,83 ^(a,b,c) | 14,5 ^(b,c) | 15,12 ^(a) | 16,35 ^(a) | 47,67 ^(c) | 6,36 ^(b) |
| PROMEDIO | 10,84 | 14,66 | 15,49 | 17,92 | 45,54 | 6,09 |

Cada valor es el promedio de tres replicas. Valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Se observa en la Tabla 7, que los granos de café verde de todas las muestras presentan un alto porcentaje de carbohidratos y fibra. Estos altos valores pueden favorecer el desarrollo de los mohos presentes en los granos de café verde, ya que proporcionan un medio adecuado para su crecimiento.

Los mohos pueden utilizar ciertos sustratos como pectinas, carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos para su desarrollo. También pueden causar problemas a través de: síntesis de metabolitos tóxicos (micotoxinas), resistencia al calor, congelamiento, antibióticos o irradiación y habilidad para alterar sustratos no favorables permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. Pueden también causar malos olores y sabores y la decoloración de las superficies de los alimentos (Frazier, 1976).

La humedad juega un papel muy importante en la calidad del grano de café verde, ya que esta puede favorecer el desarrollo de microorganismos, así como también algunas actividades enzimáticas causando detrimento del mismo. Es así como cada tipo de grano o cereal debe tener un contenido de humedad de seguridad mínimo para garantizar su estabilidad en el tiempo. La norma venezolana COVENIN 2129:1995 establece para el grano de café verde un contenido de humedad máximo de 13% para que pueda ser almacenado por largos periodos en condiciones adecuadas sin deteriorarse. De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 7 se tiene que todas las muestras analizadas están por debajo de dicho valor, encontrándose valores de humedad en las muestras que van de 10,4 % a 11,17 % y en promedio las muestras presentaron una humedad de 10,84%. La muestra proveniente de Sanare (Edo. Lara) reportó el valor más alto de humedad con un 11,17 % y la muestra de Guárico (Edo. Lara) el más bajo con un 10,4%.

Las otras determinaciones realizadas a los granos de café verde, se llevaron a cabo básicamente para caracterizar las muestras en estudio y determinar si los valores obtenidos

concordaban con valores generales promedios revisados en algunas bibliografías. También se realizaron como un aporte, ya que al momento de buscar información sobre los granos de café verde, no es mucha la información y datos que se obtienen, ya que por lo general todas las determinaciones y estudios suelen realizarse a los granos de café ya tostados.

En la mayoría de los casos para realizar las determinaciones al café verde, se siguieron métodos y procedimientos oficiales que se aplican para obtener las determinaciones en el café tostado o en otros granos sin tostar como el cacao.

Se observa en la Tabla 7 que en promedio las muestras presentan un alto porcentaje de carbohidratos 45,54%, seguido por un porcentaje de fibra de 17,92%, un porcentaje de grasa cruda de 15,49%, un porcentaje de proteína cruda del 14,66% y un porcentaje de cenizas del 6,09 %. Todos los valores obtenidos de las muestras son relativamente similares, aunque al realizar el ANOVA se obtienen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre algunos valores de las diferentes muestras evaluadas.

Al comparar estos valores obtenidos para los granos de café verde, con algunos valores presentados en la bibliografía para granos de café tostado, se observa que el porcentaje de humedad en los granos tostados es mucho menor. Según el INN en su tabla de composición de alimentos (2001), los granos de café tostado tienen un porcentaje de humedad del 4,9 %, el porcentaje de proteína es de 17%, el de grasa es de 17%, fibra cruda 7,6%, cenizas 4,5% y el de carbohidratos totales es aproximadamente 49 % (estos valores varían dependiendo de la especie de los granos de café). Estos valores resultan lógicos ya que al perder el grano un porcentaje de agua, debido a que es sometido al proceso de tostado, los otros componentes se concentran y al calcularse se encuentran en mayor proporción, que en el grano de café verde.

1.2.- Caracterización Físicoquímica de los Granos de Café Verde.

En la Tabla 8, se observan los valores de pH, acidez total titulable, actividad de agua, defectos totales de los granos evaluados y tipo de café (clasificación según % de humedad y de defectos presente en las muestras).

Tabla 8. Parámetros físicoquímicos obtenidos de los granos de café verde.

| Procedencia de las Muestras de Granos de Café | Tipo de Análisis | | | | Tipo de Café (Clasificación) |
|---|------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|
| | a _w | pH | % Acidez Total Titulable | % Defectos Totales | |
| BISCUCUY (Edo. Portuguesa) | 0,604 ^(a) | 5,22 ^(e) | 1,63 ^(d) | 32,4 ^(c) | LBD |
| BOCONO (Edo. Trujillo) | 0,634 ^(b) | 5,17 ^(d) | 1,64 ^(d) | 23,55 ^(a,b) | LBC |
| GUARICO (Edo. Lara) | 0,608 ^(a) | 5,14 ^(c) | 1,45 ^(b) | 34,21 ^(c,d) | LBD |
| RIO CLARO (Edo. Lara) | 0,649 ^(c) | 5,19 ^(d) | 1,54 ^(c) | 22,5 ^(a) | LBC |
| SANARE (Edo. Lara) | 0,627 ^(b) | 5,11 ^(a,b) | 1,25 ^(a) | 25,56 ^(b) | LBC |
| LOS TEQUES (Edo. Miranda) | 0,697 ^(d) | 5,09 ^(a) | 1,39 ^(b) | 35 ^(d) | LBD |
| MACHIQUES (Edo. Zulia) | 0,637 ^(b,c) | 5,13 ^(b,c) | 1,55 ^(c) | 24,25 ^(a,b) | LBC |
| PROMEDIO | 0,637 | 5,15 | 1,49 | 28,21 | ----- |

Cada valor es el promedio de tres replicas. Valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$).

LBC: Lavado Bueno "C"

LBD: Lavado Bueno "D"

La a_w se define como la cantidad de agua disponible para ser usada por los microorganismos, además de expresar la relación existente entre la presión de vapor de agua del producto y la del agua pura. Este es un parámetro muy importante con el cual es posible regular las condiciones de crecimiento de los hongos y su capacidad de producir micotoxinas. Los valores de a_w obtenidos en las muestras de granos de café verde evaluadas, oscilan entre 0,608 y 0,697 con un promedio de 0,637. Se puede observar que la muestra proveniente de Los Teques (Edo. Miranda)

presentó el mayor valor de a_w entre todas las muestras con un 0,697, al igual que presentó el valor más elevado de porcentajes de granos defectuosos (35%). La muestra proveniente de Biscucuy (Edo. Portuguesa) reportó el menor valor de a_w entre todas las muestras evaluadas con un 0,604. Todos los valores de a_w obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Casanova (2004) para todas sus muestras, el cual en promedio fue de 0,655.

El pH y la acidez son parámetros muy importantes ya que están íntimamente relacionados con la conservación y almacenamiento de los alimentos, así como también en el control de procesos naturales e industriales en los mismos (Álvarez, 1998).

Durante la fermentación de los frutos del cafeto, los ácidos acético y láctico son producidos por degradación microbiana de la pulpa y difundidos hacia el interior del cotiledón aumentando los niveles de acidez los cuales disminuyen luego durante el secado de los granos (Silva, 1993).

En promedio las muestras de granos de café verde evaluadas presentaron un pH de 5,15 (con valores que van de 5,09 a 5,22) y un porcentaje de acidez total de 1,49. Algunos autores sugieren que con respecto a los valores de pH, estos no tienen un gran efecto en el crecimiento de mohos toxigénicos, pero si puede tener un efecto importante en la producción de las toxinas (Bacon y col., 1973).

Se sabe que algunas especies de mohos producen sus toxinas en un pH de alrededor de los 5,4. Entonces se puede decir que los valores de pH obtenidos en las muestras de café verde analizadas son favorables para la producción de micotoxinas. Pero algunos autores han demostrado que la producción de ocratoxina A está más fuertemente influenciada por la composición del medio, especialmente por la presencia o ausencia de micronutrientes (Bacon y col., 1973).

Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los mohos se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable. Estas condiciones pueden ser a bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, la presencia de antibióticos, o la exposición del alimento a irradiaciones (Frazier, 1976).

No se encontraron estudios en donde se reportaran valores de pH y acidez en los granos de café verde, para poder comparar los valores obtenidos de estas 7 muestras analizadas, con resultados de otras investigaciones.

El porcentaje de defectos obtenidos en los granos de café verde para cada una de las muestras fue bastante variado (Tabla 7), con un promedio de 28,21%. La muestra que presentó un mayor porcentaje de defectos totales en los granos, fue la muestra proveniente de Los Teques (Edo. Miranda) con un 35% y la que reportó el valor más bajo fue la muestra de Rio Claro (Edo. Lara) con un 22,5%. En su estudio Casanova (2004) reportó un porcentaje promedio de defectos totales de 37,83% para sus muestras y concluyo que a mayor proporción de granos de café verdes defectuosos, mayor es la posibilidad de contaminación de mohos en los mismos, por lo cual es de esperarse para este estudio una alta incidencia de mohos y de porcentajes de colonización en los granos de café verde analizados.

Se obtuvo que la mayoría de las muestras de café verde con las que se trabajó se encuentran dentro de la clasificación de LBC y algunas pocas en LBD (Según los valores de % de humedad y % defectos de cada una de las muestras, entre otras características visuales).

Existen factores importantes durante la etapa previa al almacenamiento que influyen en la clasificación y calidad obtenida en los granos de café verde y del producto que se obtiene al final de

todo el proceso de tostado, como lo es la recolección de los frutos o cerezas de café durante la cosecha, ya que durante esta etapa muchos productores no solo recolectan las cerezas maduras, sino que recolectan todas las que estén presentes en el arbusto para ese momento y las mezclan procesándolas todas juntas (para ahorrar dinero y tiempo), y las centrales o plantas procesadoras de los granos reciben todos los tipos de café cosechados (verde, pintón, maduro, sobremaduro y seco). Esto hace que se produzcan cantidades apreciables de granos demasiados heterogéneos y que los granos de café verde que se obtienen no tengan una óptima calidad, y es por eso que en varias de las muestras de café verde evaluadas (como la muestra proveniente de Los Teques) se obtienen altos porcentajes de defectos en los granos, lo cual disminuye su calidad y lo hace más susceptible a la contaminación de mohos.

Se puede decir en general que en este estudio se trabajó con muestras de granos de café verde de calidad intermedia (según el porcentaje de granos defectuosos obtenido para cada una de ellas).

2.- ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

2.1.-Determinación del Contaje Total de Mohos.

Los resultados correspondientes al recuento de mohos totales presentes en las diferentes muestras evaluadas se pueden observar en la Tabla 9.

Tabla 9. Incidencia total de mohos presentes en las muestras de granos de café verde.

| Muestra de Granos de Café Verde | Procedencia de la Muestra de Granos de Café Verde | Incidencia Total de Mohos (Log ₁₀ UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) |
|---------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| M1 | BISCUCUY (Edo. Portuguesa) | 4,52 ^(b) | 3,3 x10 ⁴ (b) |
| M2 | BOCONO (Edo. Trujillo) | 4,35 ^(b) | 2,3 x10 ⁴ (b) |
| M3 | GUARICO (Edo. Lara) | 3,25 ^(a) | 1,8 x10 ³ (a) |
| M4 | RIO CLARO (Edo. Lara) | 4,53 ^(b) | 3,6 x10 ⁴ (b) |
| M5 | SANARE (Edo. Lara) | 3,23 ^(a) | 2,0 x10 ³ (a) |
| M6 | LOS TEQUES (Edo. Miranda) | 4,86 ^(c) | 7,3 x10 ⁴ (c) |
| M7 | MACHIQUES (Edo. Zulia) | 4,78 ^(c) | 6,3 x10 ⁴ (c) |
| PROMEDIO | ----- | 4,22 | 3,31 x10⁴ |

Cada valor es el promedio de tres replicas. Valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$). UFC indica unidades formadoras de colonias.

En la Tabla 9 se observa que la incidencia total de mohos obtenida entre las diferentes muestras de café verde evaluadas, osciló entre valores de 7,3 x10⁴ UFC/g a 1,8 x10³ UFC/g, siendo el promedio total de 3,31 x10⁴ UFC/g. De las 7 muestras examinadas todas presentaron incidencia de mohos, lo que se traduce en que el 100% de las mismas presentaron contaminación externa de los granos. Al realizar el análisis de varianza (ANOVA), se observó que existen diferencias significativas en cuanto a la incidencia de mohos entre algunas de las muestras,

siendo esta mayor en las muestras provenientes de Machiques (Edo. Zulia) y de Los Teques (Edo. Miranda) con un $6,3 \times 10^4$ UFC/g y un $7,3 \times 10^4$ UFC/g respectivamente. La incidencia de mohos fue menor en las muestras provenientes de Guárico (Edo. Lara) y Bocono (Edo. Trujillo) con un $1,8 \times 10^3$ UFC/g y un $2,3 \times 10^4$ UFC/g para cada caso.

Estos resultados muestran una alta incidencia de mohos en los granos de café verde analizados, independientemente de la región de procedencia. Esto puede estar relacionado en gran medida al porcentaje de granos defectuosos presentes en cada una de las muestras y a malas condiciones de procesamiento, transporte y almacenamiento de los granos, hasta que son recibidos por las plantas procesadoras.

Casanova (2004) evaluó la incidencia de mohos en 47 muestras de café verde venezolano proveniente de tres regiones diferentes (Santa Cruz de Mora, Barquisimeto y Caripe) encontrando contaminación superficial en todas las muestras, con valores que variaban de 1×10^2 UFC/g a 8×10^4 UFC/g con un promedio general de $3,9 \times 10^4$ UFC/g. Como puede apreciarse en la Tabla 9, los valores obtenidos para las muestras de café verde venezolano en este estudio se hallan en el mismo orden de magnitud de 10^4 UFC/g, que los resultados reportados por Casanova (2004) para sus muestras.

De manera similar Mislivec y col. (1983) evaluaron la incidencia de mohos en varias muestras de café verde venezolano (5 muestras provenientes de distintas regiones) y encontraron también una alta incidencia de mohos en las mismas.

Abreu (2004) evaluó 25 muestras de café verde provenientes de 15 lotes con la finalidad de estudiar la micobiota presente y los niveles de ocratoxina A, y obtuvo que la incidencia total de

mohos fue en promedio de $1,6 \times 10^4$ UFC/g. Este resultado coincide con el valor promedio obtenido en este estudio el cual fue de $3,31 \times 10^4$ UFC/g.

La alta incidencia superficial de mohos reportados por los diversos estudios refleja que los granos de café verde están sometidos a una gran manipulación, carencia de buenas prácticas agrícolas y de manufactura, cosecha de cerezas sobremaduras, además de la implementación de procesos como la fermentación (beneficio húmedo) y secado inadecuado. Esto pudo ser constatado y visto de cerca durante la obtención de la muestra de café verde proveniente de Los Teques (Edo. Miranda).

También, la incidencia de mohos en las muestras analizadas puede estar relacionada con su porcentaje de granos defectuosos (partidos, picados por insectos, amarillentos, y de color negro), ya que la ruptura de los granos, fracturas o daños debido a la acción de insectos, hacen a los granos altamente susceptibles al desarrollo fúngico.

2.2.-Determinación del Grado de Infestación o Colonización de los Granos de Café.

En la Tabla 10 se observan los resultados obtenidos para el grado de infestación de las muestras de granos de café verde evaluadas.

Tabla 10. Grado de colonización de los granos de café verde evaluados.

| Muestra de Granos de Café Verde | Procedencia de la Muestra de Granos de Café Verde | % de Colonización de los Granos |
|---------------------------------|---|---------------------------------|
| M1 | BISCUCUY (Edo. Portuguesa) | 84,33 ^(d) |
| M2 | BOCONO (Edo. Trujillo) | 76 ^(c) |
| M3 | GUARICO (Edo. Lara) | 46,67 ^(a) |
| M4 | RIO CLARO (Edo. Lara) | 74,67 ^(c) |
| M5 | SANARE (Edo. Lara) | 66 ^(b) |
| M6 | LOS TEQUES (Edo. Miranda) | 80 ^(c,d) |
| M7 | MACHIQUES (Edo. Zulia) | 98 ^(e) |
| PROMEDIO | ----- | 75,09 |

Cada valor es el promedio de tres replicas. Valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Se puede apreciar que todas las muestras presentaron colonización interna, siendo el porcentaje promedio de colonización de 75,09 % entre todas las muestras, variando los valores entre 46,67 % y 98% de colonización. Los porcentajes más bajos se obtuvieron de las muestras provenientes de Guárico (Edo. Lara) y Sanare (Edo. Lara) con un 46,67% y un 66% respectivamente, estas muestras también presentaron los valores más bajos de incidencia de mohos.

Los resultados de porcentaje de colonización más altos se obtuvieron de las muestras provenientes del municipio Machiques (Edo. Zulia), Biscucuy (Edo. Portuguesa) y Los Teques (Edo. Miranda) con un 98% ; 84,33% y un 80% para cada caso, estas muestras las cuales también presentaron una alta incidencia de mohos.

Estos resultados indican una alta colonización interna de los granos de café verde, en la mayoría de las muestras evaluadas y al realizar el análisis de varianza se obtuvo que existen diferencias significativas en cuanto al grado de colonización de los granos dependiendo de la procedencia de la muestra.

Las semillas y granos generalmente arrojan porcentajes altos de propágulos fúngicos, convirtiéndose en el principal vector de distintas enfermedades. El contagio de las semillas y granos puede producirse en distintos momentos desde su recolección y más frecuentemente durante su almacenaje, dado que las condiciones de humedad y temperatura utilizadas generalmente para almacenar granos, son también óptimas para el desarrollo fúngico (Madigan y Martinko, 2006).

Por lo general una alta contaminación de esporas de hongos representa un alto potencial de flora fúngica micotoxigénica. Las esporas fúngicas, germinan cuando se encuentran en un medio apropiado, lo que implica primordialmente, que exista humedad disponible. Pero en general, la mayoría de los hongos necesita menos humedad que las bacterias, para su desarrollo. Por esta razón, muchos hongos pueden crecer en alimentos de baja humedad, como cereales, granos y harinas (Frazier, 1976).

La germinación consiste en una activación del metabolismo, seguido por un abultamiento de la espora de la cual se origina un pequeño tubo germinativo. El tubo se alarga hasta convertirse

en una hifa que ramifica y continúa desarrollándose hasta dar lugar a un nuevo organismo (Frazier, 1976).

Gracias al proceso de desinfección o tratamiento que se le aplicó a los granos de café verde antes de colocarlos en las placas con agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), fue posible observar crecimiento fúngico proveniente de una contaminación interna con esporas fúngicas, de dichos granos. Todas las muestras de granos de café verde sembrados estuvieron asociados a crecimiento de mohos, lo que demuestra que no solo los mohos están presentes de forma externa en los granos, sino que también están presentes dentro de los mismos y en condiciones adecuadas pueden desarrollarse.

La desinfección de los granos de café verde con NaCl al 0,4% antes de la siembra en las placas inactiva la microbiota externa, permitiendo el conteo de los mohos que invaden el grano. Es posible que la intensa manipulación, el daño de la superficie externa del grano debido a golpes, roedores, insectos, malos procesos de secado que agrietan el grano, etc, y el contacto directo con el suelo favorezcan la infección de los granos y la penetración de los hongos invasores al interior de los mismos. La importancia de este alto grado de colonización radica en que los granos que han sido colonizados por mohos serán deteriorados por estos microorganismos y se verá afectado su valor nutricional, además de producir decoloración y manchado de los granos, cambios en las propiedades organolépticas, pérdida del poder germinativo, menor vida útil de almacenamiento, desarrollo de hongos micotoxigénicos y si las condiciones son favorables puede ocurrir síntesis de micotoxinas.

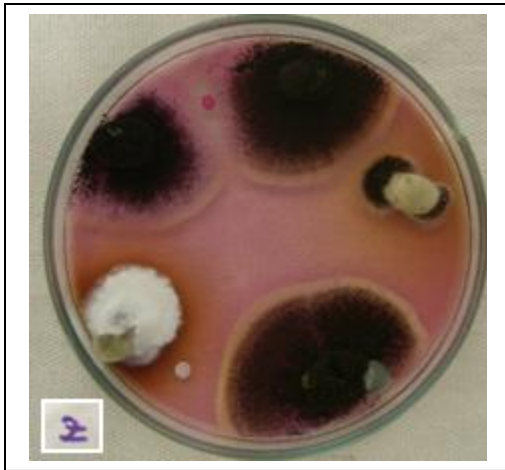
El alto porcentaje de colonización de las muestras provenientes de las diferentes regiones evaluadas, está relacionado con los valores de incidencia de los mohos encontrados en la superficie dependiendo de la región geográfica en la cual fue cultivado el grano de café verde. Se observa que

a mayor incidencia de mohos (contaminación externa de los granos) en las muestras evaluadas, el porcentaje de colonización (contaminación interna del grano) también es elevado.

Es importante señalar que el alto grado de colonización de los granos está influenciado por malas prácticas agronómicas en el manejo del cultivo, así como, durante las etapas de cosecha, fermentación y almacenamiento de los granos.

El porcentaje de colonización es de gran importancia ya que además de sugerir la posible presencia de micotoxinas y de influir en gran medida en la estabilidad de los granos durante el almacenamiento, los granos colonizados o mohosos constituyen parte de lo que se conoce como granos defectuosos, junto con los granos negros, mordidos, manchados, inmaduros, arrugados, aplastados, etc. Lo que en conjunto constituye un parámetro de calidad de los granos de café verde (COVENIN 604-93).

Los porcentajes de colonización obtenidos en los granos de café verde en este estudio, coinciden con los resultados reportados por Casanova (2004), los cuales indicaron que la totalidad de las 47 muestras que analizó presentaron un alto grado de colonización el cual fue variable entre las regiones en estudio y comprendido entre un 70 y 75%. También coincide con los resultados reportados por Abreu (2004) en donde la totalidad de las 25 muestras analizadas de café verde presentaron una alta colonización interna, con valores comprendidos entre 76 y 100%, siendo el porcentaje promedio de 93,6%.



(a)



(b)

Figura 24. (a) y (b) Granos de café verde colonizados principalmente por *Aspergillus niger* Muestra M7 – Machiques (Edo. Zulia).



(a)



(b)

Figura 25. (a) y (b) Granos de café verde colonizados por distintas especies de mohos. Muestra M7 – Machiques (Edo. Zulia).

2.3-Identificación de los Mohos Presentes en los Granos de Café Verde.

La identificación se realizó en base a las características de las colonias, y la observación microscópica de las estructuras reproductivas del moho de acuerdo a Samson y col. (1995).

Los hongos filamentosos o mohos, son organismos eucariotas multicelulares constituidos por micelios verdaderos y que se nutren por absorción. Su crecimiento sobre los alimentos se reconoce por su aspecto algodonoso-aterciopelado, que por lo general, presenta distintos colores, (Madigan y Martinko, 2006).

Las especies de mohos encontradas (Tabla 11) en promedio para todas las muestras de granos de café verde evaluadas (antes de la aplicación del tratamiento de microondas) a nivel superficial del grano fueron: *Aspergillus niger* (63,10 %), *Aspergillus ochraceus* (6,48 %), *Penicillium citrinum* (10,64 %), *Fusarium sp.* (1,49 %), *Mucor sp.* (4,99 %), *Rhizopus sp.* (3,81 %), *Aspergillus fumigatus* (3,26 %), *Aspergillus tamarii* (1,94 %), y otros (*Cladosporium herbarum*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum candidum* y *Aspergillus flavus*) (4,84 %).

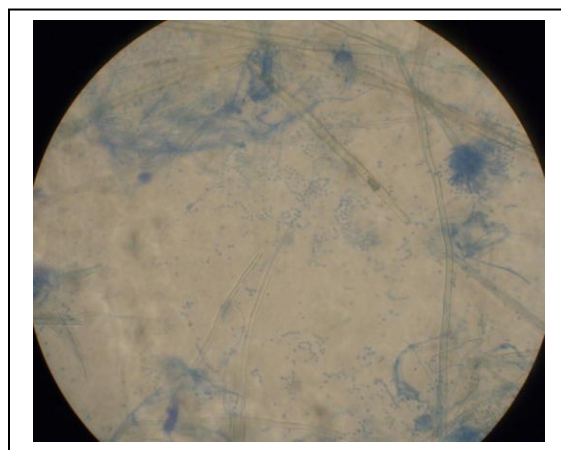


Figura 26. *Aspergillus ochraceus* visto al microscopio.

Tabla 11. Porcentaje de mohos presentes en la superficie (contaminación externa) de los granos de café verde, para cada muestra evaluada según su procedencia.

| Procedencia de la Muestra de Granos de Café Verde | Mohos | | | | | | | | |
|---|-----------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------|
| | <i>A. niger</i> | <i>P. citrinum</i> | <i>A. ochraceus</i> | <i>Fusarium sp.</i> | <i>Mucor sp.</i> | <i>Rhizopus sp.</i> | <i>A. fumigatus</i> | <i>A. tamarii</i> | Otros |
| BISCUCUY (Edo. Portuguesa) | 48,48 % | 15,15 % | 6,06 % | 6,06 % | 3,03 % | 3,03 % | 3,03 % | 3,03 % | 9,10 % |
| BOCONO (Edo. Trujillo) | 56,53 % | 8,69 % | 4,35 % | 4,35 % | 4,35 % | 4,35 % | 8,69 % | ----- | 8,69 % |
| GUARICO (Edo. Lara) | 77,80 % | 5,55 % | ----- | ----- | ----- | ----- | 5,55 % | 5,55 % | 5,55 % |
| RIO CLARO (Edo. Lara) | 72,22 % | 8,33 % | ----- | ----- | 8,33 % | ----- | 5,56 % | ----- | 5,56 % |
| SANARE (Edo. Lara) | 60,00 % | 10,00 % | 10,00 % | ----- | 5,00 % | 5,00 % | ----- | 5,00 % | 5,00 % |
| LOS TEQUES (Edo. Miranda) | 62,50 % | 12,50 % | 25,00 % | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| MACHIQUES (Edo. Zulia) | 57,16 % | 14,28 % | ----- | ----- | 14,28 % | 14,28 % | ----- | ----- | ----- |
| PROMEDIO | 63,10 % | 10,64 % | 6,48 % | 1,49 % | 4,99 % | 3,81 % | 3,26 % | 1,94 % | 4,84 % |

Cada valor es el promedio de tres replicas.

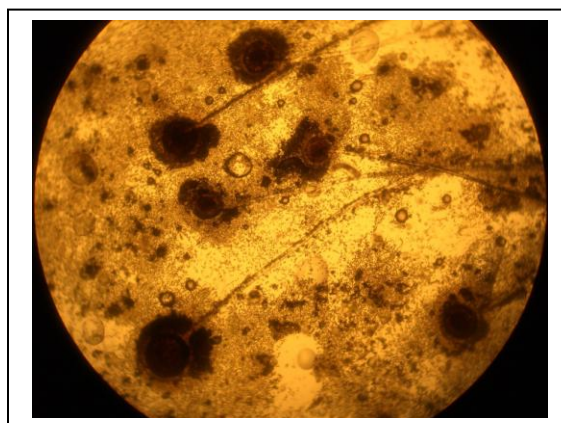
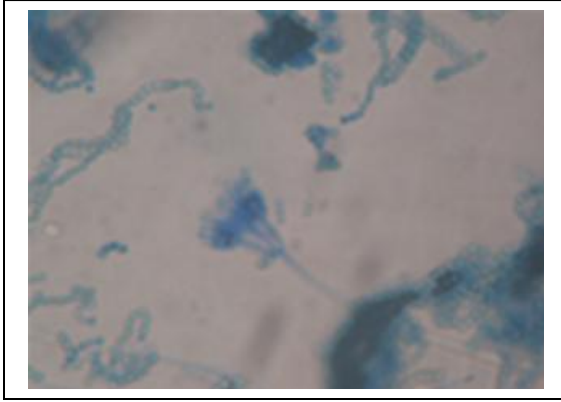
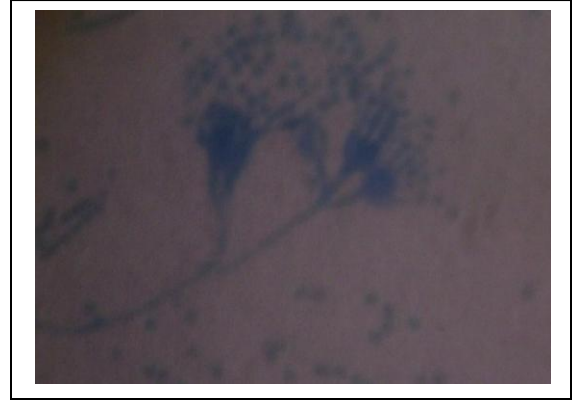


Figura 27. *Aspergillus niger* visto al microscopio.



(a)



(b)

Figura 28. (a) y (b) *Penicillium citrinum* visto al microscopio.

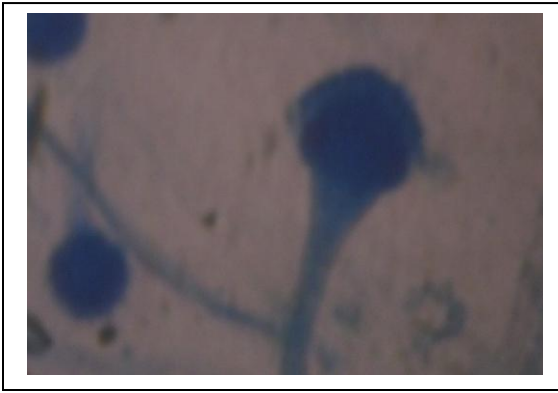


Figura 29. *Aspergillus fumigatus* visto al microscopio.

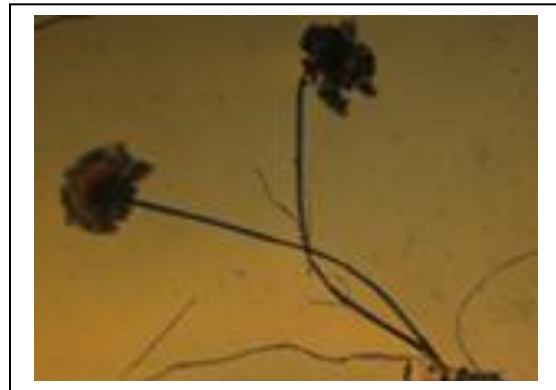


Figura 30. *Rhizopus sp.* visto al microscopio.

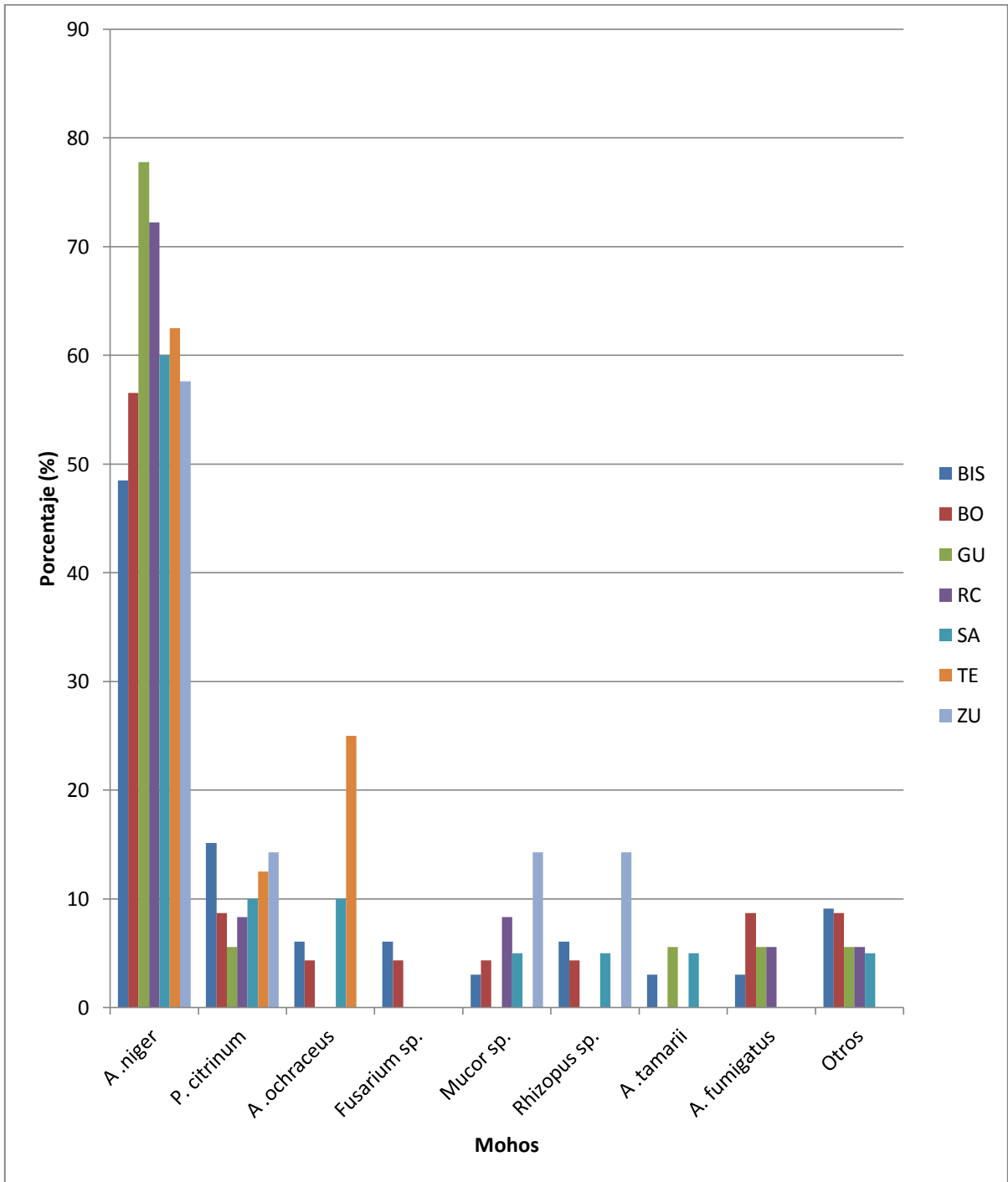


Figura 31. Especies de mohos presentes en la superficie (contaminación externa) de los granos de café verde, en cada una de las muestras analizadas según su procedencia.

En la Tabla 11 y Figura 31 se observa que la especie *A .niger* se encontró en una alta proporción a nivel superficial, en los granos de café verde de todas las muestras evaluadas, en comparación con las otras especies de mohos determinadas. Se obtuvo que la muestra proveniente de Guárico (Edo. Lara) reportó la más alta contaminación con *A .niger* con un porcentaje de 77,80 % según el número de colonias contabilizadas. Las otras muestras provenientes del Estado Lara también presentaron una alta contaminación con esta especie, aunque reportaron valores inferiores que los obtenidos para la muestra de Guárico. La muestra proveniente de Biscucuy (Edo. Portuguesa) reportó el valor más bajo con un 48,48 % para esta especie de moho. En promedio *A .niger* se encontró en todas las muestras evaluadas en un 63,10 % y las demás especies de mohos encontradas tenían valores por debajo del 11%.

Tabla 12. Porcentaje de mohos colonizantes (contaminación interna) de los granos de café verde, para cada muestra según su procedencia.

| Procedencia de la Muestra de Granos de Café Verde | Mohos | | | | | | | | |
|---|-----------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|-------------------|---------------|
| | <i>A .niger</i> | <i>P. citrinum</i> | <i>A .ochraceus</i> | <i>Fusarium sp.</i> | <i>Mucor sp.</i> | <i>Rhizopus sp.</i> | <i>A .flavus</i> | <i>A .tamarii</i> | Otros |
| BISCUCUY (Edo. Portuguesa) | 45,23 % | 9,52 % | 4,76 % | 9,52 % | 7,15 % | 9,52 % | 7,15 % | ----- | 7,15 % |
| BOCONO (Edo. Trujillo) | 52,63 % | 15,78 % | 2,64 % | ----- | 10,52 % | 7,89 % | ----- | 5,27 % | 5,27 % |
| GUARICO (Edo. Lara) | 52,17 % | ----- | ----- | 8,70 % | 17,39 % | 13,04 % | ----- | ----- | 8,70 % |
| RIO CLARO (Edo. Lara) | 45,94 % | 10,81 % | ----- | 10,81 % | 10,81 % | 10,81 % | 2,71 % | ----- | 8,11 % |
| SANARE (Edo. Lara) | 48,48 % | 12,12 % | 6,07 % | ----- | 12,12 % | 12,12 % | ----- | ----- | 9,09 % |
| LOS TEQUES (Edo. Miranda) | 55,00 % | 12,50 % | 5,00 % | 5,00 % | 7,50 % | 7,50 % | ----- | 2,50 % | 5,00 % |
| MACHIQUES (Edo. Zulia) | 55,10 % | 12,24 % | 6,12 % | 6,12 % | 8,16 % | 8,16 % | 2,05 % | 2,05 % | ----- |
| PROMEDIO | 50,65 % | 10,42 % | 3,51 % | 5,74 % | 10,52 | 9,86 % | 1,70 % | 1,40 % | 6,20 % |

Cada valor es el promedio de tres replicas.

En la Tabla 12 se observa para cada muestra de café verde evaluada, según su procedencia, las especies de mohos colonizantes encontradas (contaminación interna de los granos).

Se tiene que las especies de mohos encontradas (Tabla 12) en promedio para todas las muestras de granos de café verde evaluadas (antes de la aplicación del tratamiento de microondas) a nivel interno del grano fueron: *Aspergillus niger* (50,65 %), *Aspergillus ochraceus* (3,51 %), *Penicillium citrinum* (10,42 %), *Fusarium sp.* (5,74 %), *Mucor sp.* (10,52 %), *Rhizopus sp.* (9,86 %), *Aspergillus flavus* (1,70 %), *Aspergillus tamaritii* (1,40 %), y otros (*Cladosporium herbarum*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum candidum*) (6,20 %).

En la Tabla 12 y Figura 32 se observa que también al igual que en el caso anterior, la especie *A .niger* se encontró en una alta proporción a nivel interno (infestación), en los granos de café verde de todas las muestras evaluadas, en comparación con las otras especies de mohos determinadas. Se obtuvo que la muestra proveniente del municipio Machiques (Edo. Zulia) reportó la más alta contaminación interna con *A .niger* con un porcentaje de 55,10 % según el número de granos colonizados. Las otras muestras provenientes del Estado Lara también presentaron una alta contaminación con esta especie. La muestra proveniente de Biscucuy (Edo. Portuguesa) mostró el valor más bajo con un 45,23 % (esta muestra también reportó el valor más bajo de contaminación externa del grano para esta especie de moho). En promedio *A .niger* se encontró en todas las muestras evaluadas en un 50,65 % y las demás especies de mohos encontradas reportaron valores por debajo del 11%.

Después de *A .niger* las especies de mohos que se encontraron en promedio en mayor proporción en los granos de café verde fueron: *P. citrinum*, *Mucor sp.*, y *Rhizopus sp.* La especie de *A .ochraceus* solo se encontró en un 3,51 % en promedio para todas las muestras.

Según los resultados obtenidos se puede decir que a una elevada proporción de contaminación externa del grano de café verde, es posible que la contaminación interna también sea elevada.

La especie más predominante en todas las muestras evaluadas, tanto para la contaminación superficial como para la contaminación interna de los granos de café verde fue *A .niger* la cual representó el (54,79 %) de todas las especies de mohos encontradas, seguido de *P. citrinum* (10,81 %), *A .ochraceus* (4,17 %), *Fusarium sp.* (4,42 %), *Mucor sp.* (8,11%), *Rhizopus sp.* (7,37%), *Aspergillus flavus* (1,97%), *Aspergillus tamarii* (1,73%), *Aspergillus fumigatus* (1,47%) y otros (*Cladosporium herbarum*, *Penicillium sp.* y *Geotrichum candidum*) (5,16%).

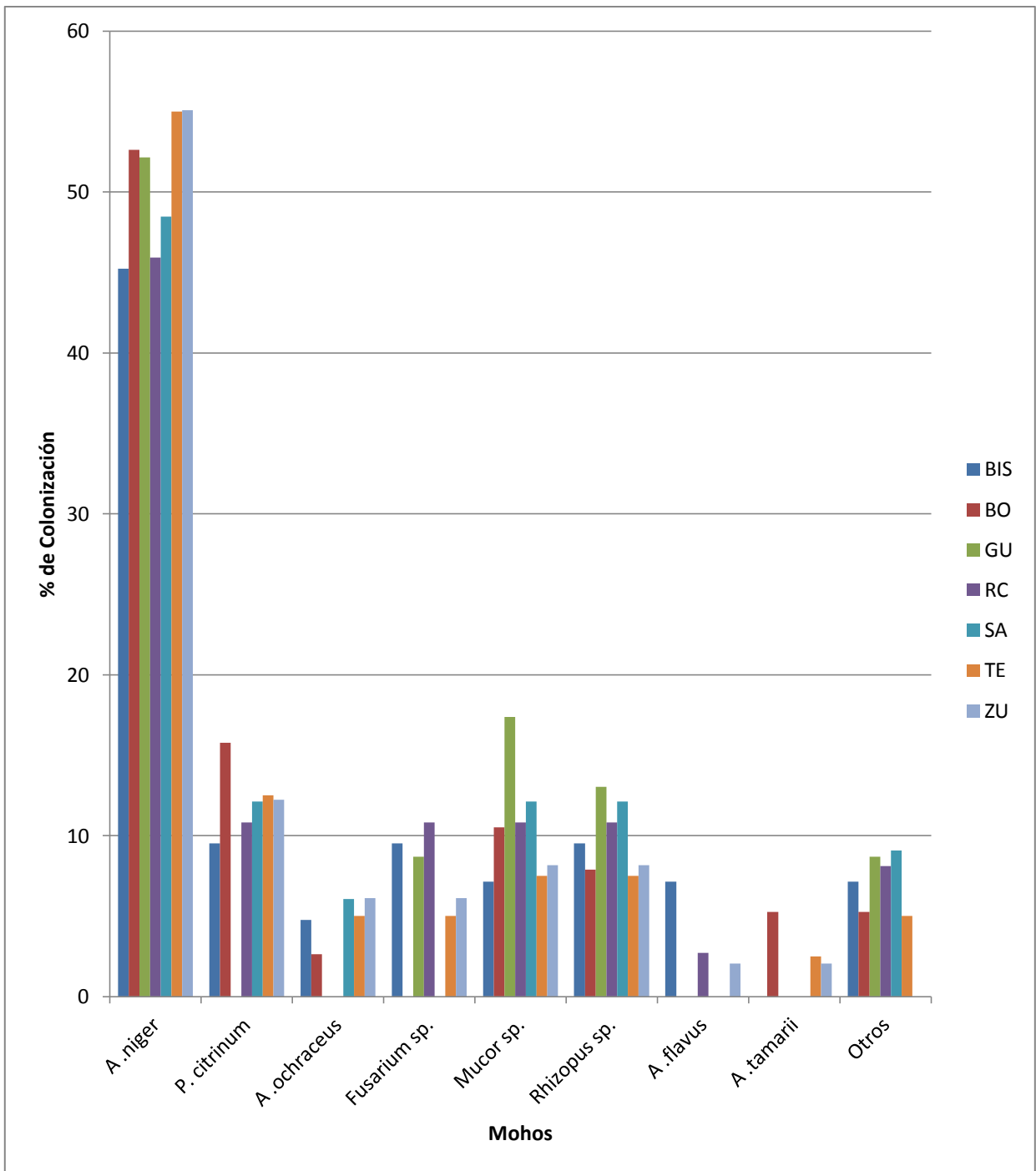


Figura 32. Especies de mohos colonizantes (contaminación interna) encontradas en los granos de café verde, en cada una de las muestras analizadas según su procedencia.

El género *Aspergillus* es el dominante en los granos de café verde estudiados. Este resultado es de esperarse ya que *Aspergillus* es un género que se ha asociado como patógeno del café, este es

considerado como un hongo de almacenamiento, sin embargo también se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, además el suelo es considerado como una fuente de inóculo primario en el cual se encuentran todos los mohos que después afectan a las plantas y granos.

El género *Fusarium sp.* es considerado como un hongo invasor, por lo cual se puede encontrar con frecuencia en los granos de café verde, y el género *Penicillium sp.*, es un hongo ampliamente difundido en la naturaleza, pudiéndose encontrar tanto en el suelo como en los granos de café.

De este estudio es importante resaltar la presencia de especies de hongos potencialmente productoras de micotoxinas, como es el caso de *A. niger* y *A. ochraceus* que pueden producir ocratoxinas, *Aspergillus flavus* puede producir aflatoxinas y *P. citrinum* puede producir citrinina.

El porcentaje de *Aspergillus niger* encontrado en las muestras evaluadas, puede ser debido a que esta es una especie que resulta ser más competitiva en los climas tropicales por algún mecanismo selectivo. Según Pitt, (2002) las características de esta especie actúan como un elemento de protección ante la alta intensidad de luz solar que incide los países del trópico.

Aspergillus flavus puede crecer sobre la planta así como en el material almacenado, pudiendo actuar como una fuente de inóculo primario. *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium citrinum* se asocian a un crecimiento sobre el material almacenado y *Cladosporium sp.*, se relaciona a materia en descomposición.

Los resultados de este estudio indican que en los granos de café verde podría existir un riesgo a la salud ya que los mismos se encuentran contaminados con especies que se han comprobado son capaces de producir micotoxinas. Se podría pensar que el riesgo de la presencia de

micotoxinas en el café no es tan importante, ya que el proceso de tostado elimina significativamente a la microflora asociada, pero algunas micotoxinas como la ocratoxina A, son bastante estables a altas temperaturas debido a sus elevados puntos de fusión y pueden permanecer presentes en los granos de café tostados.

En general los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los resultados reportados por Martínez (1991), Raybaudi (1999) y Escobar (2000), quienes coinciden en que el género de moho colonizante predominante en granos es *Aspergillus sp.*

Mislivec y col. (1983) realizaron un estudio con café verde proveniente de distintos países del mundo, entre ellos Venezuela, reportando una incidencia de mohos colonizantes tales como *Aspergillus niger* (22,8%), *Aspergillus ochraceus* (9,6%), *Aspergillus glaucus* (22,4%), *Aspergillus flavus* (0,4%), *Aspergillus tamarii* (14,4%), *Aspergillus wentii* (9,6%), *Aspergillus versicolor* (0,8%) y *Penicillium citrinum* (2,4%). Estos resultados coinciden con los encontrados en este estudio en el cual se observa que *Aspergillus niger* es la especie de moho colonizante de mayor frecuencia en los granos de café verde.

Mislivec y col. (1983) y Urbano y col. (2001) encontraron que algunas especies del género *Penicillium* fueron halladas regularmente en los granos de café verde, sin embargo el porcentaje de presencia fue substancialmente menor en comparación con el género *Aspergillus*, lo cual concuerda igualmente con los resultados obtenidos. Al parecer, las temperaturas de países tropicales como Venezuela, no son óptimas para el crecimiento de especies del género *Penicillium*.

En estudios anteriores Mislivec y col. (1975) indicaron que la flora fúngica en café verde pertenecía principalmente a *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus versicolor*, mientras que la ocurrencia de *Aspergillus niger*, *Aspergillus wentii*, y

Aspergillus tamarii era esporádica, sugiriendo que estas especies podrían ser más competitivas en un clima tropical.

Los datos obtenidos también concuerdan con los resultados reportados por Casanova (2004) en los cuales indica que la microflora presente en los granos de café verde esta básicamente constituida por *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium sp.*, observándose una predominante presencia de *Aspergillus* de la sección *Nigri*.

Abreu (2004) reportó que la micobiota predominante en las muestras de granos de café verde consistió en especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* y *Aspergillus ochraceus*, por lo que se puede decir que *Aspergillus niger* es la especie colonizante de mayor frecuencia en el café verde venezolano.

Lacey y Magan (1991) señalan el efecto de la disponibilidad de agua sobre la colonización de granos de cereales por miembros del genero *Aspergillus*. También indican que en el caso de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* estos requieren de una actividad de agua mayor o igual a 0,95 como actividad de agua optima para la colonización.

Northlt y Bullerman (1982) señalan que para el desarrollo de *Aspergillus ochraceus* se requiere una actividad de agua mayor o igual a 0,83 para su crecimiento.

Esto indica que muy posiblemente la contaminación de los granos de café verde por estas especies de mohos, ocurre a nivel de campo, durante la cosecha o durante los procesos de fermentación de los frutos, y no durante su almacenamiento, debido a los bajos valores de actividad de agua reportados por cada una de las muestras evaluadas en este estudio. Los granos de café verde generalmente poseen una actividad de agua baja (alrededor de 0,65) luego del proceso de secado.

Pero durante el almacenamiento de los granos de café verde, al ya estar contaminados lo que ocurre es el desarrollo y crecimiento de estos mohos y además si las condiciones son favorables los mismos pueden llegar a producir las micotoxinas.

2.4.-Evaluación de la Capacidad Toxigénica de las Cepas Fúngicas Aisladas.

A partir de las cepas identificadas como *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus*, fueron aisladas 14 y 9 cepas respectivamente para comprobar la capacidad de producción de ocratoxina A (OTA). De las 14 cepas de *A. niger* evaluadas todas mostraron capacidad de producir la ocratoxina A, lo que se traduce en un 100% de resultados positivos. De las 9 cepas de *A. ochraceus* aisladas, ninguna dio resultados positivos para la producción de ocratoxina A, es decir 0%.

De las 7 muestras de café verde evaluadas, todas presentaron cepas productoras de ocratoxina A.

Para determinar la capacidad productora de ocratoxina A de cada cepa, se observó la coloración emitida de todas las cepas evaluadas bajo luz ultravioleta (UV), siendo la misma de una fluorescencia con un color azul verdoso luego de la corrida cromatográfica, para las cepas que dieron positivas para la producción de micotoxina.

También se calcularon los R_f para cada caso y estos se compararon con los valores obtenidos por Abreu (2004), ya que no se disponía de solución estándar de ocratoxina A para el momento de la realización de este estudio. Abreu (2004) obtuvo un valor de R_f de 0,57 para la solución estándar y valores entre 0,58 y 0,59 para las cepas que fueron positivas en la producción de ocratoxina A. Los valores de R_f obtenidos de todas las cepas que presentaron fluorescencia después de la corrida cromatográfica en este estudio variaron entre 0,56 a 0,59.

Levi, (1980) encontró un 20,8% de cepas de *A. ochraceus* capaces de producir OTA en medios sintéticos. Urbano y col. (2001) luego de incubar durante 7 días cepas de *A. ochraceus* y *A. niger* en caldo YES e inocular en placas de TLC, encontraron un 88,1% y un 11,5% de las cepas respectivamente fueron productoras de OTA, y el 75 % de las muestras evaluadas de café verde presentaron cepas con producción de ocratoxina.

Abreu (2004) obtuvo un 11,1% de cepas de *A. ochraceus* que producían ocratoxina A y 0% en las cepas de *A. niger*. Casanova (2004) reportó que de 47 muestras analizadas, el 85 % resultaron contaminadas con ocratoxina A.

Los hongos toxigénicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las diferencias encontradas en cuanto al porcentaje de cepas positivas para la producción de la ocratoxina A en los diferentes estudios realizados pueden deberse a factores como el genotipo de las cepas de los mohos aislados, la especie de café verde evaluada, ubicación geográfica, temperatura, actividad de agua y humedad relativa, los cuales son factores importantes con respecto a la producción de las micotoxinas.

La presencia de mohos en el alimento no implica automáticamente la presencia en éste de micotoxinas. Una micotoxina puede permanecer en un producto en el que no observemos crecimiento fúngico. Una determinada especie de hongo puede producir más de un tipo de micotoxina, con propiedades de difundirse a través de los alimentos, ya que son muy hidrosolubles, (Madigan y Martinko, 2006).

La contaminación fúngica de los alimentos a partir de hongos filamentosos puede tener como consecuencia el deterioro de los mismos, pero mayor importancia tiene la capacidad de

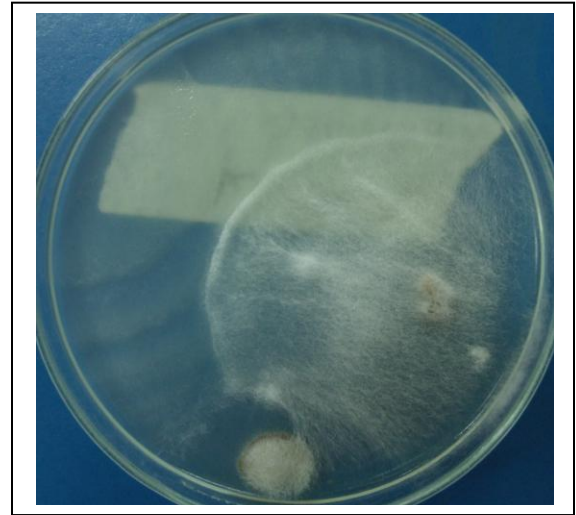
muchos de esos hongos para producir una gran variedad de metabolitos tóxicos (micotoxinas) a los que son sensibles el hombre y el resto de los animales (Madigan y Martinko, 2006).

Éstas son extremadamente carcinogénicas al interferir con las enzimas que son responsables de la síntesis de los ácidos nucleicos y son considerados mutagénicos, teratogénicos y hepatotóxicos para muchas especies vivas incluyendo los humanos (Frazier, 1976).

Las micotoxinas ejercen su poder tóxico en cantidades extremadamente bajas, como partes por billón. Son capaces de causar graves enfermedades que afectan al hígado, riñón y órganos formadores de sangre (Madigan y Martinko, 2006).



(a)

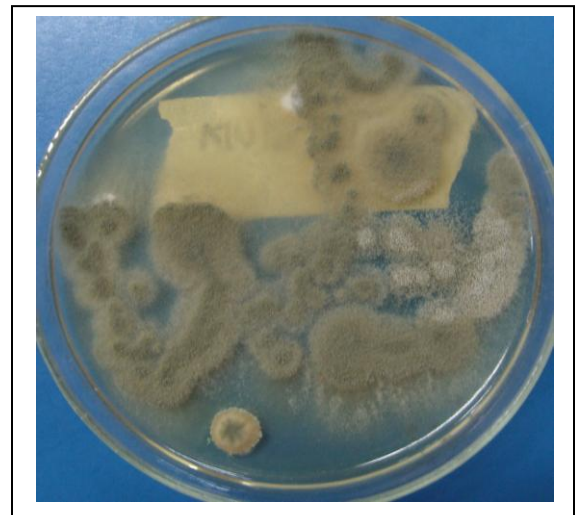


(b)

Figura 33. (a) y (b) Anverso y reverso de una placa de Petri con cultivo de moho *Fusarium sp.*, aislado en agar Czapek.



(a)

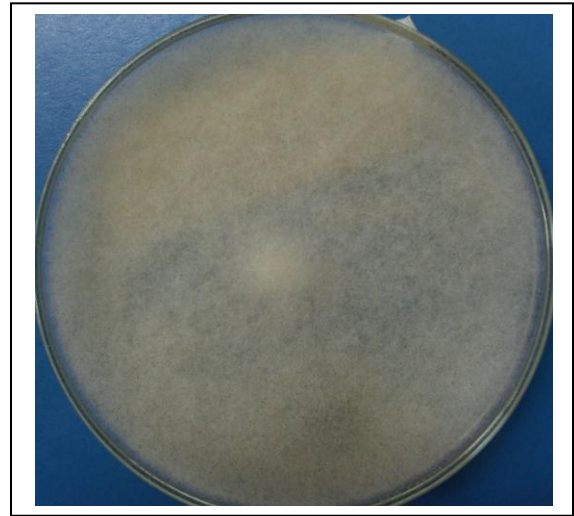


(b)

Figura 34. (a) y (b) Anverso y reverso de una placa de Petri con cultivo de moho *Penicillium sp.*, aislado en agar Czapek.

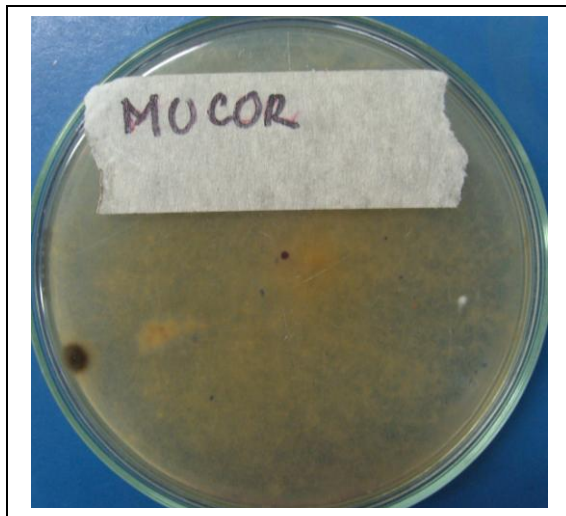


(a)

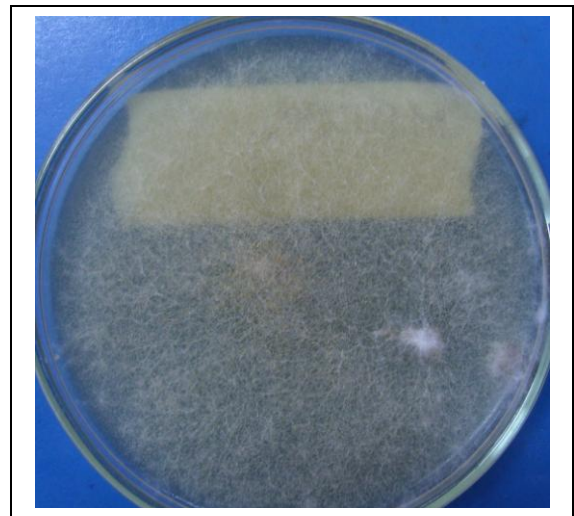


(b)

Figura 35. (a) y (b) Anverso y reverso de una placa de Petri con cultivo de moho *Rhizopus sp.*, aislado en agar Extracto de Malta (EMA).



(a)

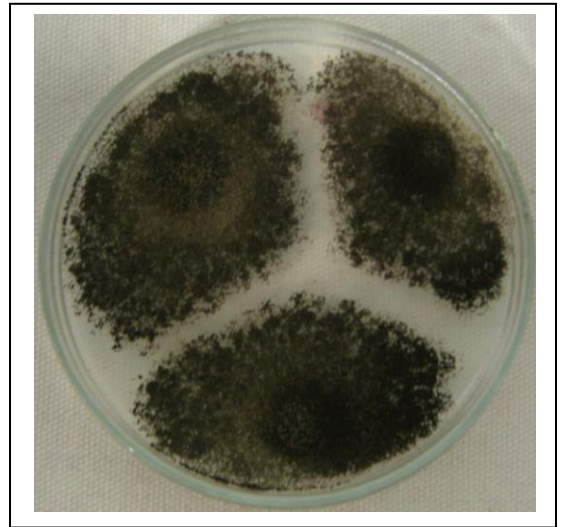


(b)

Figura 36. (a) y (b) Anverso y reverso de una placa de Petri con cultivo de moho *Mucor sp.*, aislado en agar Extracto de Malta (EMA).



(a)

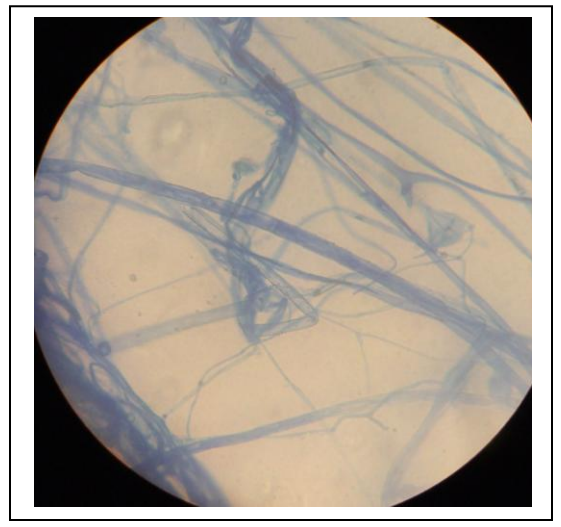


(b)

Figura 37. (a) y (b) Aislamiento de colonia de *Aspergillus niger* en placas de Petri con agar Extracto de Malta (EMA) y agar Czapek.



(a)



(b)

Figura 38. (a) y (b) Aislamiento de colonia del genero *Fusarium sp.*, en placas de Petri con agar Czapek y *Fusarium sp.*, visto al microscopio.

2.5.- Aplicación de los Tratamiento de Microondas a los Granos de Café Verde.

En la Tabla 13 y Figura 39, pueden observarse los resultados obtenidos para la incidencia de mohos en los granos de café verde de las muestras evaluadas, después de la aplicación de los tratamientos de las microondas.

Tabla 13. Incidencia total de mohos en los granos de café verde, para cada una de las muestras, después de la aplicación de los tratamientos con microondas, a diferentes tiempos de exposición.

| Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | Procedencia de la Muestra | | | | | | | PROMEDIO |
|---|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------|
| | BISCUCUY (BIS) | BOCONO (BO) | GUARICO (GU) | RIO CLARO (RC) | SANARE (SA) | TEQUES (TE) | ZULIA (ZU) | |
| | Incidencia (Log UFC/g) | | | | | | | |
| 0 | 4,56 ^(p) | 4,31 ^(ñ) | 3,28 ^(l,m) | 4,1 ^(n,ñ) | 3,29 ^(l,m) | 4,95 ^(q) | 4,2 ^(n,ñ) | 4,09 |
| 1 | 4,01 ^(n,ñ) | 3,69 ^(m) | 2,99 ^(g,h,i,j) | 3,92 ^(m,n,ñ) | 3,05 ^(h,i,j,k) | 4,33 ^(ñ) | 3,97 ^(n,ñ) | 3,71 |
| 3 | 3,78 ^(m,n) | 3,15 ^(j,k,l) | 2,83 ^(f,g) | 3,1 ^(i,j,k,l) | 2,87 ^(f,g,h) | 3,25 ^(k,l,m) | 3,72 ^(m) | 3,24 |
| 5 | 3,19 ^(k,l,m) | 2,8 ^(f,g) | 2,26 ^(b,c) | 2,8 ^(f,g) | 2,46 ^(c,d) | 2,92 ^(f,g,h,i) | 3,36 ^(m) | 2,83 |
| 7 | 2,78 ^(f,g) | 2,50 ^(e) | 2 ^(a) | 2 ^(a) | 2 ^(a) | 2,1 ^(a,b) | 2,73 ^(f) | 2,30 |
| 10 | 2 ^(a) | 2,1 ^(a,b) | 2 ^(a) | 2 ^(a) | 2 ^(a) | 2 ^(a) | 2 ^(a) | 2,01 |

Cada valor es el promedio de tres replicas. Valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$). UFC indica unidades formadoras de colonias.

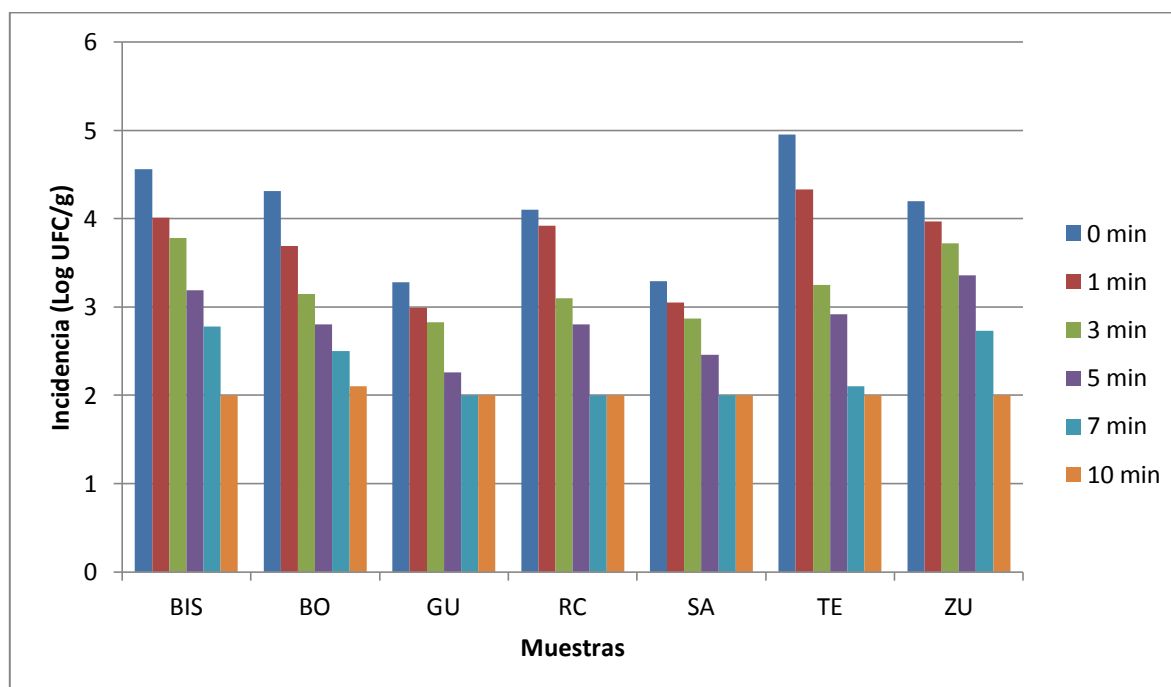


Figura 39. Incidencia de mohos en los granos de café verde, para cada una de las muestras, después de la aplicación de los tratamientos de microondas a diferentes tiempos de exposición.

En la Figura 39 puede visualizarse con facilidad el efecto que producen las microondas sobre la incidencia de mohos en los granos de café verde. Se observa que a mayor tiempo de exposición hay una disminución en la incidencia de los mohos presentes en todas las muestras de granos de café verde evaluadas. La tendencia a la disminución de la incidencia es similar en todas las muestras, pero al realizar el análisis de varianza se obtienen que existen diferencias significativas entre estas disminuciones ($p \leq 0,05$).

Los granos de café verde de todas las muestras evaluadas, a los 0 minutos de exposición a las microondas, presentaron en promedio una incidencia total de mohos de 4,09 Log UFC/g, después de 1 minuto de exposición fue de 3,71 Log UFC/g, luego de los 3 minutos de exposición al tratamiento fue de 3,24 Log UFC/g, después de los 5 min fue de 2,83 Log UFC/g, luego de los 7 min de aplicación de las microondas fue de 2,30 Log UFC/g, y al finalizar los 10 min fue de 2,01 Log UFC/g, estos resultados indican que en promedio hubo una reducción del grado de incidencia de mohos en los granos de café verde de aproximadamente 2 ciclos log ($2 \log_{10}$) si se compara la incidencia inicial de los granos de café verde a los 0 minutos de exposición, con la obtenida después de los 10 min de exposición a las microondas.

Se puede decir que hubo un efecto notorio del poder antifúngico de las radiaciones de microondas sobre los granos de café verde. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos controles (sin tratamiento) y los granos de café verdes sometidos a los diferentes tratamientos de microondas (a los diferentes tiempos de exposición).

No se encontraron otros estudios similares a este, en los cuales se aplicaran radiaciones de microondas sobre granos de café verde o algún otro grano y se reportaran los efectos de las microondas en la incidencia de mohos y los porcentajes de infestación en dichos granos, para

comparar con los resultados obtenidos en esta investigación. La mayoría de estudios encontrados están relacionados con otros productos y otros microorganismos (por lo general bacterias), sin embargo en dichos estudios se observa al igual que en este, una reducción o eliminación de dichos microorganismos en los productos evaluados al aplicar las radiaciones de microondas a diferentes tiempos y a diferentes potencias.

Por ejemplo Jamshidi y col., 2010, estudiaron el efecto de la radiación de las microondas en muestras de carne inoculadas con *E. coli* O157: H7. La evaluación la realizaron a diferentes tiempos de exposición de los trozos de carne a las microondas (10, 20, 30, 40 y 50 segundos), el cual era domestico. Ellos concluyeron que la radiación de las microondas con 70 °C elimina la contaminación con *E. coli* O157: H7 en la superficie de las rebanadas de carne.

Woo y col., 2000, estudiaron el efecto de la radiación de microondas sobre suspensiones de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, obteniendo una reducción dramática de los recuentos viables. Realizaron también estudios de microscopia electrónica de barrido lo que revelo graves daños en la superficie de la mayoría de las células de *E. coli*, pero no hubo cambio significativo en las células de *B. subtilis*.

Gedikli y col., 2008, evaluaron el efecto de las microondas sobre *E. coli*, *B. cereus* y *S. aureus*. Ellos compararon diferentes grados de inactivación por varios tiempos de exposición, la cantidad inicial de las células y el poder del microondas. Los datos experimentales mostraron que las microondas producen un efecto letal sobre las bacterias evaluadas debido al calor generado durante la exposición a las microondas. Ellos encontraron que la máxima eficiencia de las microondas fue a los 60 segundos del tiempo de exposición, con una concentración inicial de 1×10^8 células bacterianas de *E. coli* con una potencia de 900W.

Tabla 14. Porcentaje de colonización de mohos (contaminación interna) en los granos de café verde, para cada una de las muestras evaluadas, después de la aplicación de los tratamientos con microondas, a diferentes tiempos de exposición.

| Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | Procedencia de la Muestra | | | | | | | PROMEDIO |
|---|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|--------------|
| | BISCUCUY (BIS) | BOCONO (BO) | GUARICO (GU) | RIO CLARO (RC) | SANARE (SA) | TEQUES (TE) | ZULIA (ZU) | |
| | % de Colonización | | | | | | | |
| 0 | 82 ^(p,q) | 75,33 ^(n,o) | 45,33 ^(i,j) | 73,33 ^(n,o) | 64 ^(l) | 72,67 ^(m,n,o) | 95,33 ^(r) | 72,57 |
| 1 | 74,67 ^(n,o) | 64 ^(l) | 32,67 ^(g,h) | 66,67 ^(m,n) | 52,67 ^(k) | 62,67 ^(l) | 86,67 ^(q) | 62,86 |
| 3 | 63,33 ^(l) | 54,67 ^(k) | 22,67 ^(e,f) | 53,33 ^(k) | 43,33 ⁽ⁱ⁾ | 54 ^(k) | 78,67 ^(o,p) | 52,86 |
| 5 | 43 ⁽ⁱ⁾ | 25,33 ^(f) | 13,33 ^(c,d) | 34,67 ^(h) | 27,33 ^(f,g) | 33,33 ^(g,h) | 51,33 ^(j,k) | 32,62 |
| 7 | 22 ^(e,f) | 9,33 ^(b,c) | 4,67 ^(a,b) | 18 ^(d,e) | 13,33 ^(c,d) | 13,33 ^(c,d) | 26 ^(f) | 15,24 |
| 10 | 10,67 ^(b,c) | 2,67 ^(a) | 0,67 ^(a) | 4,67 ^(a,b) | 2 ^(a) | 5,33 ^(a,b) | 18,67 ^(d,e) | 6,38 |

Cada valor es el promedio de tres replicas. Valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$).

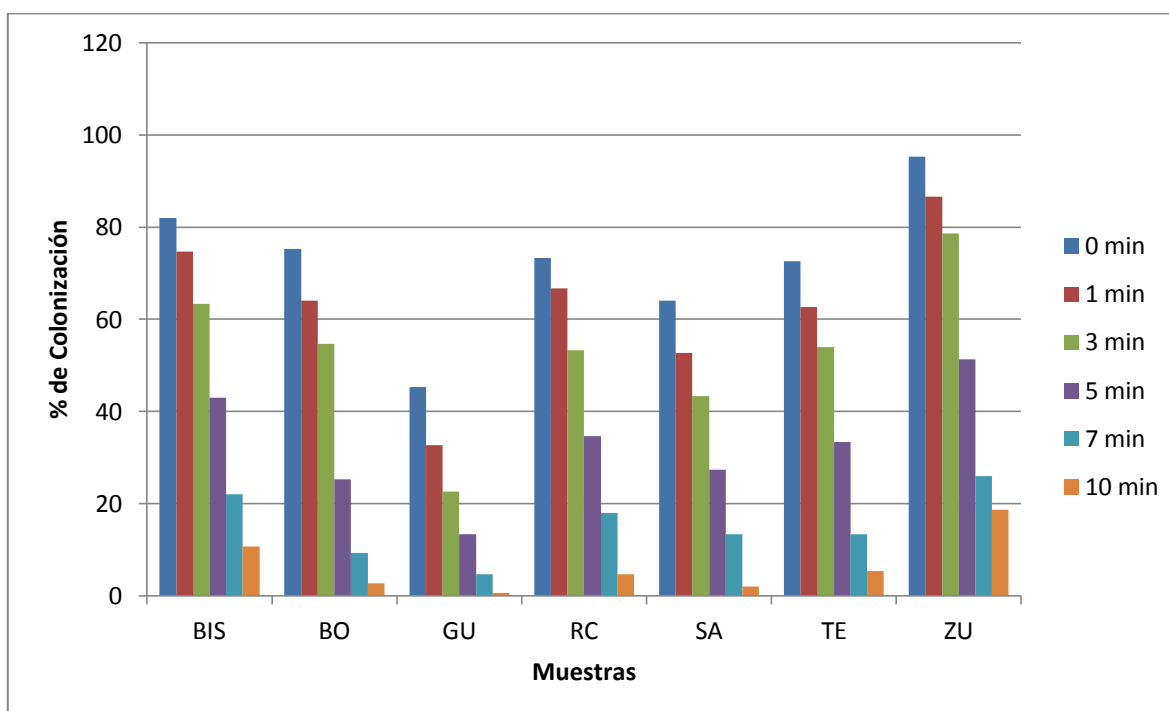


Figura 40. Porcentaje de colonización de mohos (contaminación interna) en los granos de café verde, en cada una de las muestras evaluadas, después de la aplicación de los tratamientos de microondas a diferentes tiempos de exposición.

El mismo efecto que se observó sobre la incidencia de los mohos presentes en los granos de café verde, se obtuvo en los resultados del grado de infestación de los granos, es decir que a mayor tiempo de exposición de las muestras a las radiaciones de microondas se observó una disminución en el porcentaje de colonización de los mohos en todas las muestras de granos de café verde evaluadas.

También se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos controles (sin tratamiento) y los granos de café verdes sometidos a los diferentes tiempos de tratamientos de microondas (a los diferentes tiempos de exposición).

Los granos de café verde de todas las muestras evaluadas, a los 0 minutos de exposición a las microondas, presentaron en promedio un porcentaje de colonización del 72, 57 %, después de 1 minuto de exposición fue de 62,86 %, luego de los 3 minutos de exposición al tratamiento fue de 52,86 %, después de los 5 min fue de 32,62%, luego de los 7 min de aplicación de las microondas fue de 15,24%, y al finalizar los 10 min fue de 6,38%, estos resultados indican que en promedio hubo una reducción final del porcentaje de colonización en los granos de café verde a los 10 min de tratamiento con respecto a los 0 min de tratamiento del 91, 70 % (si se compara con el porcentaje inicial de colonización de los granos de café verde a los 0 minutos, con el obtenido después de los 10 min de exposición a las microondas).

Después de la aplicación de los tratamientos de microondas la especie de moho predominante en todas las muestras de granos de café verde continuo siendo *Aspergillus niger*, aunque en menor proporción. El número de colonias contabilizadas para todas las especies de mohos se redujo drásticamente, en comparación con las muestras a las cuales no se les aplico ningún tratamiento.

Después de la aplicación de los distintos tratamientos de microondas a los granos de café verde, se aislaron 7 cepas de *Aspergillus niger*, y se evaluó su capacidad micotoxigénica. Todas las cepas de cada una de las muestras dieron resultados positivos para la ocratoxina A. Por lo que se puede decir que las microondas no eliminan la capacidad de las cepas de *Aspergillus niger* de producir micotoxinas.

Al aplicar las microondas a las muestras de granos de café verde, estos alcanzaban valores de temperatura de hasta 60 °C. Los valores de temperatura se incrementaban a medida que se prolongaban los tiempos de exposición de los granos de café a las radiaciones de microondas.

Las características físicas de los granos de café verde después de la aplicación de los tratamientos permanecieron iguales que al comienzo (sin la aplicación de tratamiento de microondas), no se observaron cambios ni en el color, ni en la textura de los granos, a excepción del tratamiento durante 10 min de exposición a las microondas, en donde luego de la aplicación del mismo, los granos de café verde cambiaron ligeramente la tonalidad del color verde y lucían algo más amarillos, como se observa en la Figura 41. Este efecto se observó en todas las muestras evaluadas.



Figura 41. Coloración de los granos de café verde sin aplicación de tratamiento de microondas Vs. la coloración de los granos de café verde después de 10 min de exposición a las microondas. Muestra M7 – Machiques (Edo. Zulia).

En la Tabla 15, se pueden observar los valores obtenidos para la actividad de agua, de cada una de las muestras, después de la aplicación de los tratamientos de microondas a los diferentes tiempos de exposición.

Tabla 15. Valores de actividad de agua obtenidos después de la aplicación de los tratamientos de microondas para cada muestra.

| Tratamiento de Irradiación de Microondas a una Potencia de 0,05 kW | | | | | | | | |
|--|---|------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------|
| Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | Actividad de Agua (a_w) de las Muestras | | | | | | | PROMEDIO |
| | BISCUCUY (Edo. Portuguesa) | BOCONO (Edo. Trujillo) | GUARICO (Edo. Lara) | RIO CLARO (Edo. Lara) | SANARE (Edo. Lara) | LOS TEQUES (Edo. Miranda) | MACHIQUES (Edo. Zulia) | |
| 0 | 0,602 ^(a) | 0,628 ^(b) | 0,607 ^(a) | 0,654 ^(c) | 0,621 ^(b) | 0,698 ^(d) | 0,634 ^(c) | 0,635 |
| 1 | 0,579 ^(e) | 0,609 ^(a) | 0,576 ^(e) | 0,596 ^(f) | 0,611 ^(a) | 0,671 ^(g) | 0,622 ^(b) | 0,609 |
| 3 | 0,565 ^(h) | 0,579 ^(e) | 0,557 ^(h) | 0,565 ^(h) | 0,582 ^(e) | 0,644 ^(c) | 0,594 ^(f) | 0,584 |
| 5 | 0,544 ⁽ⁱ⁾ | 0,557 ^(h,i) | 0,529 ^(j) | 0,564 ^(h,i) | 0,562 ^(h,i) | 0,613 ^(a) | 0,563 ^(h,i) | 0,562 |
| 7 | 0,527 ^(j) | 0,537 ^(j) | 0,512 ^(k) | 0,482 ^(m) | 0,541 ⁽ⁱ⁾ | 0,581 ^(e) | 0,561 ^(h,i) | 0,534 |
| 10 | 0,507 ^(k) | 0,512 ^(k) | 0,501 ^(k) | 0,439 ⁽ⁿ⁾ | 0,517 ^(k) | 0,552 ^(h,i) | 0,554 ^(h,i) | 0,512 |

Cada valor es el promedio de tres replicas. Valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Los valores de a_w disminuyeron en cada una de las muestras tratadas, a medida que se exponían durante más tiempo a las radiaciones de microondas. Este comportamiento es de esperarse ya que al aplicar los distintos tratamientos, aumentaba la temperatura de los granos de café verde y estos perdían agua. En promedio la actividad de agua que se reportó para todas las muestras a los 0 min de aplicación del tratamiento fue de 0,635 y después de la aplicación del tratamiento de los 10 min fue de 0,512, es decir que la actividad de agua disminuyó en un 19,37 %

si se compara con los valores de actividad de agua iniciales de las muestras. Al aplicar el análisis de varianza se obtiene que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las actividades de agua de todas las muestras para cada uno de los tratamientos aplicados, así como también existen diferencias significativas entre ellas al comienzo del tratamiento (para el tiempo 0 min).

Estas diferencias en la actividad de agua entre las distintas muestras, sin aplicación de tratamiento, deben estar relacionadas con la temperatura y la humedad de las zonas de donde provienen las distintas muestras, además de los métodos de procesamiento y secado que se le dieron a los granos de café verde en cada una de las regiones de procedencia de las muestras.

Conkerton y col., 1994 (citado por Alfaro, 2004) realizaron un estudio con muestras de semillas de algodón (*Gossypium sp.*) las cuales fueron expuestas a las radiaciones de microondas a 45 kW, 2450 MHz, durante 4 minutos y a una temperatura de 94°C. Este tratamiento causó un 20% de reducción de la humedad en las semillas. Al finalizar el tratamiento con microondas la evaluación demostró que no se encontró diferencias en el contenido total o soluble de proteínas, o en el contenido o color del aceite extraído, cuando fueron comparados los resultados con los realizados a semillas que no fueron tratadas con las microondas. Esta investigación concuerda con los resultados reportados en este estudio en los cuales se aprecia una disminución de la actividad de agua en los granos de café verde, al ser sometidos a mayores tiempos de exposición a las microondas.

El efecto que tienen las microondas sobre la disminución de la incidencia de mohos y el grado de colonización de los granos de café verde evaluados, debe de estar relacionado con el aumento de temperatura de los granos durante el proceso. Es por esto que a mayores tiempos de exposición a las microondas, las temperaturas que se alcanzan son más elevadas y los grados de incidencia y colonización disminuyen, al igual que disminuye la actividad de agua en las muestras.

El agua existe en los materiales, productos alimenticios y microorganismos como agua libre y enlazada. La última posee una constante dieléctrica baja, mientras que, las moléculas de agua libre poseen una alta constante dieléctrica, y se caracterizan por su gran habilidad para absorber la energía de microondas. Las microondas interactúan selectivamente con las moléculas de agua libre, produciendo un calor localizado que produce una repentina elevación de la temperatura con efectos más pronunciados en donde existe en mayor cantidad. Las células de los productos alimenticios y de los microorganismos que presentan los mismos son afectadas, ya que la temperatura aumenta rápidamente y se produce una expansión de las células dentro del sistema irradiado, y ya que todas las células contienen agua a diferentes niveles, estas no pueden mantener la alta presión interna y la ruptura se hace espontánea, provocando la muerte de los microorganismos. Esta destrucción de las células de los microorganismos va a depender en gran medida de las temperaturas que se alcancen durante el proceso de radiación, a los tiempos de exposición a los cuales sean sometidos los productos y a las potencias usadas durante la radiación de las microondas sobre las muestras.

Algunos investigadores han utilizado las microondas en procesos como la pasteurización y la esterilización industrial de ciertos productos alimenticios. En el tratamiento de pasteurización, el calentamiento por debajo del punto de ebullición del agua produce la muerte de mohos, levaduras y bacterias ácido lácticas, la temperatura misma del alimento no excede de 85 °C, en contraste la esterilización del alimento debe ser realizada entre 110-130°C, requiriendo de una presión de 20-30 psi y de un material resistente a esta presión de trabajo. En procesos de pasteurización con calentamiento convencionales de conducción, el tiempo requerido es de 30-40 min para alcanzar la temperatura, comparada con solo 3-5 min que puede conllevar el proceso con microondas. Estos tratamientos de calentamiento en cortos tiempos producen productos finales casi sin alteración de su color y sabor (Schiegel, 1992).

Los beneficios de las microondas en procesos de pasteurización y esterilización incluyen el mejoramiento de la calidad del alimento, extensión de la vida útil sin utilización de preservativos, mantenimiento de una apariencia natural, textura crocante, bajos costos ahorro de energía, bajos costos de mantenimiento, mínimo personal y tecnología más amigable (Schiegel, 1992).

En las siguientes tablas resúmenes, se reportan los resultados obtenidos para la incidencia, porcentaje de colonización de mohos y actividad de agua, antes y después de la aplicación de los tratamientos de microondas a los granos de café verde, para cada una de las muestras evaluadas.

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos para la incidencia, porcentaje de colonización de mohos y actividad de agua, presentes en la muestra de granos de café verde proveniente de Biscucuy (Edo. Portuguesa), antes y después de la aplicación del tratamiento de microondas a diferentes tiempos de exposición.

| Muestra Sin Tratamiento de Microondas (Control) | | | | Muestra con Tratamiento de Irradiación de Microondas a una potencia de 0,05 kW | | | | | |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|---|--|--|-----------------------------------|---------------------------------|--------------|--|
| BISCUCUY (Edo. Portuguesa) | | | | BISCUCUY (Edo. Portuguesa) | | | | | |
| Incidencia | | Colonización | | a_w | Incidencia | | | Colonización | |
| Incidencia Total de Mohos (Log_{10} UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | | Incidencia Total de Mohos (Log_{10} UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | a_w | |
| 4,52 ^(b) | 3,3 x10 ⁴ | 84,33 ^(d) | 0,604 ^(a) | 0 | 4,56 ^(p) | 3,67 x10 ⁴ | 82 ^(p,q) | 0,602 | |
| | | | | 1 | 4,01 ^(n,n̄) | 1,03 x10 ⁴ | 74,67 ^(n,o) | 0,579 | |
| | | | | 3 | 3,78 ^(m,n) | 6 x 10 ³ | 63,33 ^(l) | 0,565 | |
| | | | | 5 | 3,19 ^(k,l,m) | 2,33 x 10 ³ | 43 ⁽ⁱ⁾ | 0,544 | |
| | | | | 7 | 2,78 ^(f,g) | 5,67 x10 ² | 22 ^(e,f) | 0,527 | |
| | | | | 10 | 2 ^(a) | 1 x 10 ² | 10,67 ^(b,c) | 0,507 | |

Cada valor es el promedio de tres replicas. Valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$). UFC indica unidades formadoras de colonias.

En la Tabla 16 se pueden apreciar todos los resultados obtenidos para la muestra de Biscucuy (Edo. Portuguesa). Los valores obtenidos para la muestra control (sin tratamiento) y los obtenidos para el tiempo 0 min de exposición a las microondas son muy similares, ya que ninguna de estas muestras fueron expuestas a las radiaciones de microondas. Al comenzar el tratamiento se reporto una incidencia de 3,67 x10⁴ UFC/g para los 0 min, la cual fue disminuyendo hasta alcanzar un valor de 1 x 10² UFC/g después de la aplicación del tratamiento de los 10 min de microondas en los granos. El mismo comportamiento se obtuvo con los porcentajes de infestación o colonización

de los granos de café verde, el cual en un principio fue de 82 % para los granos con 0 min de exposición y después del tratamiento de los 10 min de exposición a las microondas termino en un valor de 10, 67%.

Tabla 17. Resumen de los resultados obtenidos para la incidencia de mohos, porcentaje de colonización y actividad de agua, presentes en la muestra de granos de café verde proveniente de Bocono (Edo. Trujillo), antes y después de la aplicación del tratamiento de microondas a diferentes tiempos de exposición.

| Muestra Sin Tratamiento de Microondas (Control) | | | Muestra con Tratamiento de Irradiación de Microondas a una potencia de 0,05 kW | | | | | |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|--|---|--|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| BOCONO (Edo. Trujillo) | | | BOCONO (Edo. Trujillo) | | | | | |
| Incidencia | | Colonización | a_w | Incidencia | | | Colonización | a_w |
| Incidencia Total de Mohos (Log_{10} UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | | Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | Incidencia Total de Mohos (Log_{10} UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | |
| 4,35 ^(b) | 2,3 x10 ⁴ (b) | 76 ^(c) | 0,634 ^(b) | 0 | 4,31 ^(ñ) | 2,07 x10 ⁴ | 75,33 ^(n,o) | 0,628 ^(b) |
| | | | | 1 | 3,69 ^(m) | 4,67 x10 ³ | 64 ^(l) | 0,609 ^(a) |
| | | | | 3 | 3,15 ^(j,k,l) | 1,43 x 10 ³ | 54,67 ^(k) | 0,579 ^(e) |
| | | | | 5 | 2,8 ^(f,g) | 6,33 x 10 ² | 25,33 ^(f) | 0,557 ^(h,i) |
| | | | | 7 | 2,50 ^(e) | 3,33 x10 ² | 9,33 ^(b,c) | 0,537 ^(j) |
| | | | | 10 | 2,1 ^(a,b) | 1,3 x 10 ² | 2,67 ^(a) | 0,512 ^(k) |

En la Tabla 17 se pueden apreciar todos los resultados obtenidos para la muestra de Bocono (Edo. Trujillo). Los valores obtenidos para la muestra control (sin tratamiento) y los obtenidos para el tiempo 0 min de exposición a las microondas son muy similares, ya que ninguna de estas muestras fueron expuestas a las radiaciones de microondas. Al comenzar el tratamiento se reporto una incidencia de 2,07 x10⁴ UFC/g para los 0 min, la cual fue disminuyendo hasta alcanzar un valor de 1,3 x 10² UFC/g después de la aplicación del tratamiento de los 10 min de microondas en los granos. El mismo comportamiento se obtuvo con los porcentajes de infestación o colonización de los granos de café verde, el cual en un principio fue de 75,33 % para los granos con 0 min de

exposición y después del tratamiento de los 10 min de exposición a las microondas termino en un valor de 2, 67%.

Tabla 18. Resumen de los resultados obtenidos para la incidencia de mohos, porcentaje de colonización y actividad de agua, presentes en la muestra de granos de café verde proveniente de Guárico (Edo. Lara), antes y después de la aplicación del tratamiento de microondas a diferentes tiempos de exposición.

| Muestra Sin Tratamiento de Microondas (Control) | | | | Muestra con Tratamiento de Irradiación de Microondas a una potencia de 0,05 kW | | | | |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------|--|--|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| GUARICO (Edo. Lara) | | | | GUARICO (Edo. Lara) | | | | |
| Incidencia | | Colonización | a_w | Incidencia | | | Colonización | a_w |
| Incidencia Total de Mohos (Log_{10} UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | | Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | Incidencia Total de Mohos (Log_{10} UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | |
| 3,25 ^(a) | 1,8 x 10 ³ (a) | 46,67 ^(a) | 0,608 ^(a) | 0 | 3,28 ^(l,m) | 1,9 x 10 ³ | 45,33 ^(i,j) | 0,607 ^(a) |
| | | | | 1 | 3,04 ^(g,h,i,j) | 1,1 x 10 ³ | 32,67 ^(g,h) | 0,576 ^(e) |
| | | | | 3 | 2,83 ^(f,g) | 6,67 x 10 ² | 22,67 ^(e,f) | 0,557 ^(h) |
| | | | | 5 | 2,26 ^(b,c) | 1,3 x 10 ² | 13,33 ^(c,d) | 0,529 ⁽ⁱ⁾ |
| | | | | 7 | 2 ^(a) | Est. < 1 x 10 ² | 4,67 ^(a,b) | 0,512 ^(k) |
| | | | | 10 | 2 ^(a) | Est. < 1 x 10 ² | 0,67 ^(a) | 0,501 ^(k) |

En la Tabla 18 se pueden apreciar todos los resultados obtenidos para la muestra de Guárico (Edo. Lara). Los valores obtenidos para la muestra control (sin tratamiento) y los obtenidos para el tiempo 0 min de exposición a las microondas son muy similares, ya que ninguna de estas muestras fueron expuestas a las radiaciones de microondas. Al comenzar el tratamiento se reporto una incidencia de 1,9 x 10³ UFC/g para los 0 min, la cual fue disminuyendo hasta alcanzar un valor de Est. < 1 x 10² UFC/g después de la aplicación del tratamiento de los 10 min de microondas en los granos. El mismo comportamiento se obtuvo con los porcentajes de infestación o colonización de los granos de café verde, el cual en un principio fue de 45,33 % para los granos con 0 min de

exposición y después del tratamiento de los 10 min de exposición a las microondas termino en un valor de 0, 67%.

Tabla 19. Resumen de los resultados obtenidos para la incidencia de mohos, porcentaje de colonización y actividad de agua, presentes en la muestra de granos de café verde proveniente de Rio Claro (Edo. Lara), antes y después de la aplicación del tratamiento de microondas a diferentes tiempos de exposición.

| Muestra Sin Tratamiento de Microondas (Control) | | | Muestra con Tratamiento de Irradiación de Microondas a una potencia de 0,05 kW | | | | | |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|--|---|--|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| RIO CLARO (Edo. Lara) | | | RIO CLARO (Edo. Lara) | | | | | |
| Incidencia | | Colonización | a_w | Incidencia | | | Colonización | a_w |
| Incidencia Total de Mohos (Log_{10} UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | | Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | Incidencia Total de Mohos (Log_{10} UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | |
| 4,53 ^(b) | 3,6 x 10 ⁴ (b) | 74,67 ^(c) | 0,649 ^(c) | 0 | 4,52 ^(o) | 3,3 x 10 ⁴ | 73,33 ^(n,o) | 0,654 ^(c) |
| | | | | 1 | 3,92 ^(m,n,ñ) | 8,33 x 10 ³ | 66,67 ^(m,n) | 0,596 ^(f) |
| | | | | 3 | 3,1 ^(i,j,k,l) | 1,33 x 10 ³ | 53,33 ^(k) | 0,565 ^(h) |
| | | | | 5 | 2,8 ^(f,g) | 6,33 x 10 ² | 34,67 ^(h) | 0,564 ^(h,i) |
| | | | | 7 | 2 ^(a) | 1 x 10 ² | 18 ^(d,e) | 0,482 ^(m) |
| | | | | 10 | 2 ^(a) | Est. < 1 x 10 ² | 4,67 ^(a,b) | 0,439 ⁽ⁿ⁾ |

En la Tabla 19 se pueden apreciar todos los resultados obtenidos para la muestra de Rio Claro (Edo Lara). Los valores obtenidos para la muestra control (sin tratamiento) y los obtenidos para el tiempo 0 min de exposición a las microondas son muy similares, ya que ninguna de estas muestras fueron expuestas a las radiaciones de microondas. Al comenzar el tratamiento se reporto una incidencia de 3,3 x 10⁴ UFC/g para los 0 min, la cual fue disminuyendo hasta alcanzar un valor de Est. < 1 x 10² UFC/g después de la aplicación del tratamiento de los 10 min de microondas en los granos. El mismo comportamiento se obtuvo con los porcentajes de infestación o colonización de los granos de café verde, el cual en un principio fue de 73,33 % para los granos con 0 min de

exposición y después del tratamiento de los 10 min de exposición a las microondas termino en un valor de 4, 67%.

Esta misma tendencia se tiene en los resultados obtenidos de las muestras de granos de café verde proveniente de Sanare (Edo. Lara), Los Teques (Edo. Miranda) y Machiques, puede observarse en las Tablas 20, 21 y 22.

Tabla 20. Resumen de los resultados obtenidos para la incidencia de mohos, porcentaje de colonización y actividad de agua, presentes en la muestra de granos de café verde proveniente de Sanare (Edo. Lara), antes y después de la aplicación del tratamiento de microondas a diferentes tiempos de exposición.

| Muestra Sin Tratamiento de Microondas (Control) | | | | Muestra con Tratamiento de Irradiación de Microondas a una potencia de 0,05 kW | | | | | | |
|---|--|---------------------------------------|--|---|---|--|---|---------------------------------------|--|------------------------|
| SANARE (Edo. Lara) | | | | SANARE (Edo. Lara) | | | | | | |
| Incidencia | | Colonización | | a _w | Incidencia | | | Colonización | | |
| Incidencia Total de Mohos (Log ₁₀ UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | | | Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | Incidencia Total de Mohos (Log ₁₀ UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | | |
| 3,23 ^(a) | 2,0 x10 ³ (a) | 66 ^(b) | | 0,627 ^(b) | 0 | 3,29 ^(l,m) | 2 x10 ³ | 64 ^(l) | | 0,621 ^(b) |
| | | | | | 1 | 3,05 ^(h,i,j,k) | 1,27 x10 ³ | 52,67 ^(k) | | 0,611 ^(a) |
| | | | | | 3 | 2,87 ^(f,g,h) | 7,33 x 10 ² | 43,33 ⁽ⁱ⁾ | | 0,582 ^(e) |
| | | | | | 5 | 2,46 ^(c,d) | 3 x 10 ² | 27,33 ^(f,g) | | 0,562 ^(h,i) |
| | | | | | 7 | 2 ^(a) | Est. < 1 x10 ² | 13,33 ^(c,d) | | 0,541 ⁽ⁱ⁾ |
| | | | | | 10 | 2 ^(a) | Est. < 1 x 10 ² | 2 ^(a) | | 0,517 ^(k) |

Tabla 21. Resumen de los resultados obtenidos para la incidencia de mohos, porcentaje de colonización y actividad de agua, presentes en la muestra de granos de café verde proveniente de Los Teques (Edo. Miranda), antes y después de la aplicación del tratamiento de microondas a diferentes tiempos de exposición.

| Muestra Sin Tratamiento de Microondas (Control) | | | | Muestra con Tratamiento de Irradiación de Microondas a una potencia de 0,05 kW | | | | | |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|---|--|---|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------|
| LOS TEQUES (Edo. Miranda) | | | | LOS TEQUES (Edo. Miranda) | | | | | |
| Incidencia | | Colonización | | a_w | Incidencia | | | Colonización | a_w |
| Incidencia Total de Mohos (Log ₁₀ UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | | Incidencia Total de Mohos (Log ₁₀ UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | | |
| 4,86 ^(c) | 7,3 x10 ⁴ (c) | 80 ^(c,d) | 0,697 ^(d) | | 0 | 4,85 ^(q) | 7 x10 ⁴ | 72,67 ^(m,n,o) | |
| | | | | 1 | 4,33 ^(ñ) | 2,67 x10 ⁴ | 62,67 ^(l) | 0,671 ^(g) | |
| | | | | 3 | 3,25 ^(k,l,m) | 1,8 x 10 ³ | 54 ^(k) | 0,644 ^(c) | |
| | | | | 5 | 2,92 ^(f,g,h,i) | 8,33 x 10 ² | 33,33 ^(g,h) | 0,613 ^(a) | |
| | | | | 7 | 2,1 ^(a,b) | 3 x10 ² | 13,33 ^(c,d) | 0,581 ^(e) | |
| | | | | 10 | 2 ^(a) | Est. < 1 x 10 ² | 5,33 ^(a,b) | 0,552 ^(h,i) | |

Tabla 22. Resumen de los resultados obtenidos para la incidencia de mohos, porcentaje de colonización y actividad de agua, presentes en la muestra de granos de café verde proveniente de Machiques (Edo. Zulia), antes y después de la aplicación del tratamiento de microondas a diferentes tiempos de exposición.

| Muestra Sin Tratamiento de Microondas (Control) | | | | Muestra con Tratamiento de Irradiación de Microondas a una potencia de 0,05 kW | | | | | |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|---|--|---|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------|-------|
| MACHIQUES (Edo. Zulia) | | | | MACHIQUES (Edo. Zulia) | | | | | |
| Incidencia | | Colonización | | a_w | Incidencia | | | Colonización | a_w |
| Incidencia Total de Mohos (Log ₁₀ UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | Tiempo de Exposición a las Microondas (min) | | Incidencia Total de Mohos (Log ₁₀ UFC/g) | Incidencia Total de Mohos (UFC/g) | % de Colonización de los Granos | | |
| 4,78 ^(c) | 6,3 x10 ⁴ (c) | 98 ^(e) | 0,637 ^(b,c) | | 0 | 4,75 ^(o) | 5,6 x10 ⁴ | 95,33 ^(r) | |
| | | | | 1 | 3,97 ^(n,ñ) | 9,3 x10 ³ | 86,67 ^(q) | 0,622 ^(b) | |
| | | | | 3 | 3,72 ^(m) | 5,3 x 10 ³ | 78,67 ^(o,p) | 0,594 ^(f) | |
| | | | | 5 | 3,36 ^(m) | 2,3 x 10 ³ | 51,33 ^(j,k) | 0,563 ^(h,i) | |
| | | | | 7 | 2,73 ^(f) | 5,3 x10 ² | 26 ^(f) | 0,561 ^(h,i) | |
| | | | | 10 | 2 ^(a) | Est. < 1 x 10 ² | 18,67 ^(d,e) | 0,554 ^(h,i) | |

VI. CONCLUSIONES.

- Los granos de café verde de todas las muestras evaluadas presentaron un alto porcentaje de carbohidratos y fibra.
- Todas las muestras de granos de café verde analizadas presentaron un porcentaje de humedad inferior al 13 %, reportándose valores de humedad que se encontraron entre los 10,4 % a 11,17 % y en promedio las muestras presentaron una humedad de 10,84%.
- Los valores de a_w obtenidos en las muestras de granos de café verde evaluadas, oscilaron entre 0,608 y 0,697 con un promedio de 0,637.
- En promedio las muestras de granos de café verde evaluadas presentaron un valor de pH de 5,15 (con valores que oscilaron entre los 5,09 a 5,22) y un porcentaje de acidez total de 1,49 (con valores que se ubicaron entre los 1,25 a 1,64).
- El porcentaje de defectos obtenidos en los granos de café verde para cada una de las muestras fue bastante variado, con un promedio de 28,21%.
- La incidencia total de mohos obtenida entre las diferentes muestras de café verde evaluadas, oscilo entre valores de $7,3 \times 10^4$ UFC/g a $1,8 \times 10^3$ UFC/g, siendo el promedio total de $3,31 \times 10^4$ UFC/g. De las 7 muestras examinadas todas presentaron incidencia de mohos, lo que se traduce en que el 100% de las mismas presentaron contaminación externa de los granos, independientemente de la región de procedencia.
- Las muestras que reportaron la más alta incidencia de mohos fueron las provenientes de Machiques (Edo. Zulia) y de Los Teques (Edo. Miranda) con un $6,3 \times 10^4$ UFC/g y un $7,3 \times 10^4$ UFC/g respectivamente. La incidencia de mohos fue menor en las muestras provenientes de

Guárico (Edo. Lara) y Bocono (Edo. Trujillo) con un $1,8 \times 10^3$ UFC/g y un $2,3 \times 10^4$ UFC/g para cada caso.

- Todas las muestras presentaron colonización interna de los granos, siendo el porcentaje promedio de colonización de 75,09 % entre todas las muestras estudiadas, variando los valores entre 46,67 % y 98% de colonización de los granos de café verde.
- Los porcentajes más bajos de colonización de los granos de café verde, se obtuvieron de las muestras provenientes de Guárico (Edo. Lara) y Sanare (Edo. Lara) con un 46,67% y un 66% respectivamente.
- Los resultados de porcentajes de colonización más altos se obtuvieron de las muestras provenientes del municipio Machiques (Edo. Zulia), Biscucuy (Edo. Portuguesa) y Los Teques (Edo. Miranda) con un 98% ; 84,33% y un 80%.
- Las especies de mohos encontradas en promedio para todas las muestras de granos de café verde evaluadas (antes de la aplicación de los tratamientos de microondas) a nivel superficial del grano fueron: *Aspergillus niger* (63,10 %), *Aspergillus ochraceus* (6,48 %), *Penicillium citrinum* (10,64 %), *Fusarium sp.* (1,49 %), *Mucor sp.* (4,99 %), *Rhizopus sp.* (3,81 %), *Aspergillus fumigatus* (3,26 %), *Aspergillus tamarii* (1,94 %), y otros (*Cladosporium herbarum*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum candidum* y *Aspergillus flavus*) (4,84 %).
- Se tiene que las especies de mohos encontradas en promedio para todas las muestras de granos de café verde evaluadas (antes de la aplicación de los tratamientos de microondas) a nivel interno del grano fueron: *Aspergillus niger* (50,65 %), *Aspergillus ochraceus* (3,51 %), *Penicillium citrinum* (10,42 %), *Fusarium sp.* (5,74 %), *Mucor sp.* (10,52 %), *Rhizopus sp.* (9,86 %), *Aspergillus flavus* (1,70 %), *Aspergillus tamarii* (1,40 %), y otros (*Cladosporium herbarum*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum candidum*) (6,20 %).

- La especie más predominante en todas las muestras evaluadas, tanto para la contaminación externa, como para la contaminación interna de los granos de café verde (antes de la aplicación de los tratamientos de microondas) fue: *A .niger* la cual represento el (54,79 %) de todas las especies de mohos encontradas.
- De las 7 muestras de café verde evaluadas, todas presentaron cepas productoras de ocratoxina A. De las 14 cepas de *A. niger* evaluadas todas mostraron capacidad de producir la ocratoxina A, lo que se traduce en un 100% de resultados positivos.
- A mayor tiempo de exposición hay una disminución en la incidencia de los mohos presentes en todas las muestras de granos de café verde evaluadas. La tendencia a la disminución de la incidencia es similar en todas las muestras, pero al realizar el análisis de varianza se obtienen que existen diferencias significativas entre estas disminuciones ($p \leq 0,05$).
- Hubo un efecto notorio del poder antifúngico de las radiaciones de microondas sobre los granos de café verde. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos controles (sin tratamiento) y los granos de café verdes sometidos a los diferentes tratamientos de microondas (a los diferentes tiempos de exposición).
- En promedio para todas las muestras hubo una reducción del grado de incidencia de mohos en los granos de café verde de aproximadamente 2 ciclos logaritmicos, si se compara la incidencia total inicial de los granos de café verde a los 0 minutos de exposición, con la obtenida después de los 10 min de exposición a las microondas.
- A mayor tiempo de exposición de las muestras a las radiaciones de microondas se observo una disminución en el porcentaje de colonización de los mohos en todas las muestras de granos de café verde evaluadas.

- Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en el porcentaje de colonización de los mohos en todas las muestras de granos de café verde evaluadas, entre los grupos controles (sin tratamiento) y los granos de café verdes sometidos a los diferentes tiempos de exposición a las microondas.
- En promedio para todas las muestras hubo una reducción del porcentaje de colonización en los granos de café verde del 91,70 % si se compara con el porcentaje de colonización inicial de los granos de café verde a los 0 minutos, con el obtenido después de los 10 min de exposición a las microondas.
- Después de la aplicación de los tratamientos de microondas la especie de moho predominante en todas las muestras de granos de café verde continuo siendo *Aspergillus niger*, aunque en menor proporción. El número de colonias contabilizadas para todas las especies de mohos se redujo drásticamente, en comparación con las muestras a las cuales no se les aplico ningún tratamiento.
- Después de la aplicación de los distintos tratamientos de microondas a los granos de café verde, se aislaron 7 cepas de *Aspergillus niger*, y se evaluó su capacidad micotoxigénica. Todas las cepas de cada una de las muestras dieron resultados positivos para la ocratoxina A.
- Las características físicas observables en los granos de café verde después de la aplicación de los tratamientos de microondas, permanecieron iguales que al comienzo (sin la aplicación de los tratamientos de microondas), no se observaron cambios en el color, ni en la textura de los granos, a excepción del tratamiento durante 10 min de exposición a las microondas, en donde luego de la aplicación del mismo, los granos de café verde cambiaron ligeramente la tonalidad del color verde y lucían algo más amarillos.

- Los valores de a_w disminuyeron en cada una de las muestras tratadas, a medida que se exponían durante más tiempo a las radiaciones de microondas.
- En promedio la actividad de agua que se reporto para todas las muestras a los 0 min de aplicación del tratamiento de microondas fue de 0,635 y después de la aplicación del tratamiento de los 10 min de exposición fue de 0,512.
- Al aplicar el análisis de varianza se obtiene que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las actividades de agua de la mayoría de las muestras para cada uno de los tratamientos aplicados, así como también existen diferencias significativas entre algunas muestras al comienzo del tratamiento (para el tiempo 0 min de exposición a las microondas).

VII. BIBLIOGRAFIA.

- Abreu, D. (2004). “Efecto del Procesamiento Sobre la Micobiota y Niveles de Ocratoxina A en Café”. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela (U.C.V). Caracas, Venezuela.
- Alfaro, M. (2004). “La Evolución de las Microondas y su Incidencia en la Industria de Alimentos”. Seminario I. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela (U.C.V). Caracas, Venezuela.
- Álvarez, C. (1998). “Caracterización Física, Química y Fisicoquímica de Granos Tostados de Cacao (*Theobroma cacao L.*) Cosechados en Tres Zonas del Estado Aragua: Chuao, Cuyagua y Cumboto”. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
- A.O.A.C. (2000). Official Methods of Analysis of the American Association of Analytical Chemists. 17th Edition. Edited by Kenneth Helrich. Virginia, USA.
- Bacon, C. W., J.G. Sweeney, J.D. Robins, and D. Burdick (1973). “Production of Penicillic Acid and Ochratoxin A on Poultry Feed by *Aspergillus ochraceus*: Temperature and Moisture Requirements”. Appl. Microbiol. 26: 155-160.
- Barrett, A.H., Cardello, A.V., Prakash, A., Mair, L., Taub, I. and Leshner, L. (1992). Optimization of Dehydrated Egg Quality by Microwaves Assisted Freeze-Drying and Hydrocolloid Incorporation. Food Process Preserv. 21: 225 - 244
- Belitz, H.D. y Grosch, W. (1985). Química de los Alimentos. Editorial ACRIBIA, S.A. Segunda Edición. Zaragoza, España.

- Bullerman, B., Schroeder, L. and Young, K. (1984). Formation and Control of Mycotoxins in Food. *J. Food Prot.* 47: 637- 646.
- Burdaspal, P. (1979). Aflatoxinas en Alimentos. *Alimentaria.* (98): 21-27.
- Carrara, E. (2003). “Micoflora, Incidencia y Comportamiento de la Ocratoxina A Durante el Procesamiento del Café Verde”. Seminario I. Facultad de Ciencias.UCV.
- Casanova, R. (2004). “Determinación de la Micobiota en el Café Verde Venezolano e Incidencia de la Ocratoxina A”. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela (U.C.V). Caracas, Venezuela.
- CYTED (Ciencia Y Tecnología Para El Desarrollo). (2003). Efecto del Procesamiento Sobre el Valor Nutricional de los Alimentos. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Conkerton, E.J., Chapital, D.C. and Wan, P.P. (1994). Microwave Heating of Cottonseed: A Pilot Plant Study. *JAOCs* 71 (4): 461 – 462.
- Corte Dos Santos, A., Hahn, D., Cahagnier, B., Drapron, R., Guilbot, A., Lefebvre, J., Multon, J.L., Poisson, J., y Trentesaux, E. (1971). “Étude de l' évaluation de plusieurs caractéristiques d' un café Arabica au cours d' un stockage experimental effectué a cinq humidités relatives diferentes”. *Café, Cacao* 15: 329-340.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. (1984). Norma Venezolana N° 2128-84. Café Verde. Determinación de la pérdida de masa a 105 °C. Fondonorma, Caracas. Venezuela.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. (1994). Norma Venezolana N° 46-1994. Café Tostado o Molido (Tercera Revisión). Fondonorma, Caracas. Venezuela.

- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. (1995). Norma Venezolana N° 383-1995. Café Verde en Sacos. Método de Muestreo (Primera Revisión). Fondonorma, Caracas. Venezuela.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. (1995). Norma Venezolana N° 2129-95. Recomendaciones para el Procesamiento Húmedo y Seco del Fruto del Cafeto. Fondonorma, Caracas. Venezuela.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. (1993). Norma Venezolana N° 604-93. Café. Definiciones. Fondonorma, Caracas. Venezuela.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. (1994). Norma Venezolana N° 609-94. Granos de Café Verde. Métodos de Ensayo. Fondonorma, Caracas. Venezuela.
- Dock, L.L. y Floros, J.D. (2000). Thermal and Nonthermal Preservations Methods, In Essentials of Functional Foods. Edited by M. Schmidt and T. Labuza in Aspen Publication, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Escobar, E. (2000). “Aislamiento, Cuantificación e Identificación de los principales mohos presentes en el grano de maíz (*Zea mays*) Provenientes de los Estados Portuguesa, Yaracuy y Bolívar y Determinación de los Niveles de Aflatoxinas y Fumonisinias (Segunda Cosecha)”. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela (U.C.V). Caracas, Venezuela.
- European Mycotoxin Awareness Network. EMAN. (2003). Fact Sheets on Surveillance and Occurrence Issues.

- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010). Producción Mundial de Café Verde. **10**. Roma, Italia.
- FEDEAGRO-CECOTUP. (1998). Fondo de Crédito Agropecuario. “La Calidad del Café Venezolano”.
- Fellows, P. (1990). Food Processing Technology. Ellis Horwood Limited. England.
- Frazier, W.C. (1976). Microbiología de los Alimentos. Editorial ACRIBIA. Segunda Edición. Zaragoza, España.
- Gedikli, S., Tabak, Ö., Tomsuk, Ö., Gabuk, A. 2008. Effect of Microwaves on Some Gram Negative and Gram Positive Bacteria. *JABS*. 2: 67-71.
- Instituto Nacional de Nutrición (INN). (2001). Tabla de Composición de Alimentos. Caracas – Venezuela.
- Jamshidi, A., Seifi. H., Kooshan, M. (2010). The Effect of Short- Time Microwave Exposures on Escherichia coli O157:H7 Inoculated on to Beet Slices. *Afr. Microbial. Res.* 4:2371- 2374.
- Jay, J. (2002). Microbiología Moderna de los Alimentos. 4ta edición. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza-España. Pag.556.
- King, D., Hocking, A. and Pitt, J. (1979). “Dicloran Rose Bengala Medium For Enumeration and Isolation of Moulds From Food”. *Appl. And Environ. Microbiol.* 37: 959-964.
- Lacey J., and Magan N. (1991). Fungi in Cereal Grains: Their Occurrence and Water and Temperature Relationship. “Cereal Grain Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage”. Edited by ELSEVIER. Poland. 5: 77-85.

- Levi, C. (1980). "Mycotoxins in Coffe". *Journal of AOAC International*; 63 (6): 1282-1285.
- Mabbett, T. (2002). "Factores Decisivos en el Manejo de Granos de Café y Cacao, Antes, Durante y Después de los Embarques. Reprint from Coffe & Cocoa Internacional.
- Mandigan, M.T., Martinko, J.M., y Parker, J. (2006). *Brock-Biología de los Microorganismos*. Editorial Pearson Prentice Hall. Decima Edición. España.
- Manzollilo, S. (2000). *Microondas em Sintese Organica*. Editorial Quim Nova. Brazil. 4: 660-667.
- Martínez, A. (1991). *Contribución al Estudio de la Flora Fúngica, su Toxigenicidad e Incidencia de Aflatoxinas en Cereales y Oleaginosas Cultivados en Venezuela*. Trabajo Especial de Ascenso. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Martinez, A. and Resnik, S.L (1994). *Status of the Mycotoxin Problem in Latinoamerica as Related to Local Preservation and Storage Practices*. VIII International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Mexico.
- Mislivec, P., Bruce, V., and Gibson, R. (1983). "Incidence of Toxigenic and Other Molds in Green Coffe Beans". *Journal of Food Protection*; 46 (11): 969-973.
- Mislivec, P., P.B., Dieter C., and Bruce, V. (1975). "Mycotoxin Producing Potencial of Mould Flora of Dried Beans". *Appl. Microbiol.* 29: 522-526.
- Northolt, M. and Bullerman, L. (1982). *Prevention of Mold Growth and Toxin Production Through Control of Environmental Conditions*. *J. Food Prot.* 45 (6): 519-526.
- Pitt, J. (2002). "Toxigenic Fungi: Which are Important". *Medical Mycology*.385: 17-22.

- Poison, J., Cahagnier, B., Multon, J.L., Hahn, D., y Corte Dos Santos, A. (1975). “La Microflore du Café: Méthode de Dénombrement et Influence Sur les Qualities Organoleptiques”. Association Scientifique Internationale du Café. 7th International Colloquium on the Chemistry of Coffe. Hamburg-Germany. pp 311-321.
- Pozar, D.M. (1993). Microwave Engineering. Addison-Wesley Publishing Company. U.S.A.
- Raybaudi, R. (1999).”Evaluación de Diferentes Métodos y Medios Micológicos para la Recuperación de Mohos Totales y Mohos Micotoxinogenicos a Partir de Maíz y Determinaciones de Aflatoxinas y Fumonisinias. Trabajo Para Optar a la Categoría de Profesor Asistente. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela (U.C.V). Caracas, Venezuela.
- Samson, R.A., Hoeskstra, E.S., Frisvad, J.C., and Filtenborg, O. (1995). “Introduction to Food Borne Fungi”. 4th Edition. Editorial Centralbureau Voor Schimmelcultures Delft. The Netherlands.
- Sancho-Madrid, M.F. (2003). Preservation of Food. U.S.A. Editorial McGraw-Hill.
- Schiegel, W. (1992). Comercial Pasteurization and Sterilization of food Products Using Microwave Technology. Food Tech. December 62-63.
- Serway, R. (1998). Física. Tomo I y II. Editorial McGraw-Hill. Cuarta Edición.
- Silva, N. (1993). “Importancia del Beneficio Sobre la Calidad del Café Tostado”. Seminario II de Post Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela (U.C.V). Caracas, Venezuela.

- Tang, J. (1998). *Microwave in Food Processing*. Department of Biological Systems Engineering. Washington State University, Pullman. U.S.A.
- Urbano, G., Taniwaki M., Leitao M. and Vicentini M. (2001). "Occurrence of Ochratoxin A – Producing Fungi in Raw Brazilian Coffee". *Journal of Food Protection*; 64 (8): 1226-1230.
- Vélez, F. y Valery, G. (1990). *Plantas Alimenticias de Venezuela (autóctonas e introducidas)*. Fundación Bigott - Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía # 37. Caracas, Venezuela.
- Woo, I. S., Rhee, I.K., Park, H. D. (2000). Differential Damage in Bacterial Cells by Microwave Radiation on Basis of Cell Wall Structure. *Depart. Food Sci. and Technol and Depart. Agri. Chem.* 5: 2243-2247.