

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TOSTIÓN DE CAFÉ TIPO PASILLA DE MÁQUINAS A
TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA EN LA
PROCESADORA DE CAFÉ CAFETAL DEL RÍO.**



DIEGO ALEJANDRO GARAY

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
ESPECIALIZACIÓN EN PROCESOS DE ALIMENTOS Y BIOMATERIALES
IBAGUÉ-COLOMBIA
2014**

*ESTANDARIZACIÓN DE LA TOSTIÓN DE CAFÉ TIPO PASILLA DE MÁQUINAS A TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA EN LA PROCESADORA DE CAFÉ CAFETAL DEL RÍO.*

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TOSTIÓN DE CAFÉ TIPO PASILLA DE MÁQUINAS A
TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA EN LA
PROCESADORA DE CAFÉ CAFETAL DEL RÍO.**

DIEGO ALEJANDRO GARAY

Directora:

**MARÍA ANGÉLICA BENAVIDES
INGENIERA QUÍMICA**

**Proyecto de grado para optar al título
de Especialista en Procesos de Alimentos y Biomateriales**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
ESPECIALIZACIÓN EN PROCESOS DE ALIMENTOS Y BIOMATERIALES
IBAGUÉ-COLOMBIA**

2014

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Ibagué, Octubre de 2014

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo con todo mi corazón a:

Dios por darme fuerza, sabiduría, paciencia y sobre todo buena salud para seguir adelante en mi camino.

A mi madre Amelia Garay por sus valores inculcados, por su amor, por su apoyo incondicional y sus valiosos consejos.

A mis hermanos Juan Daniel y Luisa Fernanda por darme alegría e inspiración.

A mi esposa María del Mar por motivarme cada día.

A todos mis amigos, compañeros de estudio, tutores y maestros, y a todos quienes sin su colaboración nunca hubiese podido culminar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

La procesadora de café tostado Cafetal del Río S.A.S. por brindarme los medios necesarios para hacer del proyecto una realidad.

A la ingeniera María Angélica Benavides, directora del proyecto, por su orientación y guía, por sus correcciones y sugerencias y sobre todo por su apoyo y confianza.

Al ingeniero Alejandro Méndez, por su buena disponibilidad y por facilitarme los medios para llevar a cabo mis actividades académicas.

Al ingeniero Jesús Antonio Rubiano, por su guía y acompañamiento y por introducirme en el maravilloso mundo del café.

Al analista de laboratorio Christian Camilo Cartagena, por su valiosa orientación.

RESUMEN

Se realizó la estandarización del proceso de tosti3n de caf3 por medio de cromatograf3a l3quida de alta eficiencia, utilizando como materia prima caf3 tipo pasilla de m3quinas contaminada de manera natural por Ochratoxina A (OTA), y a trav3s de una curva de tosti3n se obtuvo caf3 tostado con un contenido de Ochratoxina A menor de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, l3mite establecido por la Uni3n Europea y la FAO para el caf3 tostado y molido en el a3o 2004.

Se sigui3 un dise3o experimental completamente al azar fijando como variable la temperatura final, hasta obtener los diferentes grados de tosti3n: clara, media, oscura y muy oscura, el tiempo de tosti3n se fij3 como una constante. La recolecci3n de datos y de muestras se realiz3 a partir de la cuarta asada de cada tratamiento.

La determinaci3n de Ochratoxina A se realiz3 por cromatograf3a l3quida de alta eficiencia o HPLC en fase reversa, con columnas de inmuoafinidad y un detector de fluorescencia y tomando como referencia el m3todo oficial AOAC 2004.10 (2005) para obtener como variable de respuesta la concentraci3n de la Ochratoxina A en el caf3 tostado. El an3lisis de datos se realiz3 utilizando hojas de c3lculo de Excel de Microsoft Office 2007 mediante an3lisis de varianza ANOVA y test de contrastes de Fisher de la Diferencia M3nima Significativa ($p < 0,05$).

Se encontr3 que el tratamiento de grado de tosti3n muy oscuro reduce el contenido de OTA en un 99% frente al contenido original de la materia prima y en base a los consumos de gas natural durante su producci3n, se determin3 que la cantidad de calor necesaria para reducir la OTA a niveles seguros requiri3 un consumo energ3tico de 3956,53 KJ/Kg caf3 verde, cantidad de energ3a que asegura la conformidad del producto.

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| CAPITULO I | 12 |
| 1. GENERALIDADES DEL PROYECTO | 12 |
| 1.1. Introducción | 12 |
| 1.2. Descripción Del Problema | 13 |
| 1.3. Objetivos | 14 |
| 1.3.1. Objetivo General | 14 |
| 1.3.2. Objetivos Específicos | 14 |
| 1.4. Justificación | 15 |
| CAPITULO II | 17 |
| 2. MARCO CONCEPTUAL | 17 |
| 2.1. Marco De Referencia | 17 |
| 2.2. Las Micotoxinas | 19 |
| 2.2.1. La Ochratoxina A. | 20 |
| 2.2.2. Toxicidad de la Ochratoxina A. | 21 |
| 2.2.3. La Ochratoxina A y el café. | 23 |
| 2.3. El Café | 25 |
| 2.3.1. Origen y botánica del café. | 25 |
| 2.3.2. Beneficio del café. | 26 |
| 2.3.3. Café verde pasilla de máquinas | 27 |
| 2.4. La Trilla | 28 |
| 2.4.1. Recibo y limpieza del pergamino | 28 |
| 2.4.2. Trilla | 28 |
| 2.4.3 Selección neumática | 29 |
| 2.4.4 Selección por color | 29 |
| 2.4.5 Empaque | 29 |
| 2.5. La Tostión | 30 |
| 2.5.2. Cambios químicos durante la tostión | 32 |
| 2.5.3. Curva de tostión | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6. Cromatografía Líquida De Alta Eficiencia | 34 |
| CAPITULO III | 36 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| 3.1. Materia Prima | 36 |
| 3.2. Equipos | 36 |
| 3.3. Material De Laboratorio | 37 |
| 3.4. Reactivos | 37 |
| 3.5. Metodología | 38 |
| 3.5.1. Tostión | 38 |
| 3.5.2. Molienda | 39 |
| 3.5.3. Análisis de Ochratoxina A. | 39 |
| 3.5.4. Análisis estadístico | 40 |
| 3.6. Resultados Y Discusión | 40 |
| 3.7. Análisis De Ochratoxina A Por HPLC | 43 |
| 3.7.1. Curva de calibración | 43 |
| 3.8. Análisis De Varianza | 44 |
| 3.9. Calculo del Calor Necesario para Reducir la OTA | 47 |
| CONCLUSIONES | 51 |
| RECOMENDACIONES | 52 |
| REFERENCIAS | 53 |
| ANEXOS | 59 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Concentración de Ochratoxina A en el café | 15 |
| Tabla 2. Principales metabolitos tóxicos producidos por hongos contaminantes de los alimentos. | 20 |
| Tabla 3. Principales efectos de la toxicidad crónica de la OTA. | 22 |
| Tabla 4. Límites para la OTA en el café ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) vigentes en algunos países europeos. | 24 |
| Tabla 5. Requisitos para café verde pasilla | 27 |
| Tabla 6. Cambios que ocurren en el café a distintos grados de calor durante el tostado | 32 |
| Tabla 7. Cambios químicos que ocurren en el café durante el tostado | 33 |
| Tabla 8. Condiciones de tosti3n | 38 |
| Tabla 9. Caracterización del contenido inicial de OTA en Pasilla de máquinas | 42 |
| Tabla 10. Contenido de Ochratoxina A en el café tostado de color claro | 44 |
| Tabla 11. Análisis de varianza | 45 |
| Tabla 12. Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura química de la Ochratoxina A (OTA). | 21 |
| Figura 2. Estructura del fruto y del grano de un cafeto | 25 |
| Figura 3. Cromatografo líquido | 34 |
| Figura 4. Curvas de tostión promedio | 43 |
| Figura 5. Curva de calibración de OTA | 44 |
| Figura 6. Grafica de las medias de los tratamientos | 46 |
| Figura 7. Porcentaje de reducción de OTA frente a la materia prima | 47 |
| Figura 8. Diagrama de flujos de masa y energía de tostadora Probatone 25 | 49 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo A. Perfil de temperaturas de los ciclos de tostión de café color claro | 60 |
| Anexo B. Perfil de temperaturas de los ciclos de tostión de café color medio | 61 |
| Anexo C. Perfil de temperaturas de los ciclos de tostión de café color oscuro | 62 |
| Anexo D. Perfil de temperaturas de los ciclos de tostión de café | 63 |
| Anexo E. Cromatograma de materia prima y tostiones | 64 |
| Anexo F. Cromatograma de curva de calibración y tostiones | 65 |

CAPITULO I

1. GENERALIDADES DEL PROYECTO

1.1. Introducción

Café de Colombia es el nombre que se le da al café 100% arábigo cosechado en las distintas zonas cafeteras de Colombia. La bebida o infusión que se obtiene a partir de las semillas tostadas y molidas de la planta del cafeto tiene el reconocimiento a nivel mundial por sus características suaves, acidez alta, un cuerpo balanceado y un aroma pronunciado. Estas características sensoriales son el resultado de la suma de múltiples factores como el origen botánico, sus diferentes variedades cultivadas, el origen volcánico de los suelos y su cambiante topografía, la adecuada distribución de las lluvias durante el año y el clima, las buenas prácticas agrícolas y de manufactura que incluyen una recolección manual selectiva, el beneficio por vía húmeda y un adecuado secado. (Café de Colombia, 2010)

De acuerdo a la norma técnica colombiana NTC 3633 el café pasilla es el producto de la trilla del café que se caracteriza por ser un grano no apto como excelso de exportación y que tiene un tamaño de grano superior a 4,76 mm, es más susceptible de estar y ser contaminada por mohos capaces de sintetizar micotoxinas, siendo la Ochratoxina A la más importante debido a que es un metabolito secundario con propiedades neurotóxicas, inmunotóxicas, genotóxicas y teratogénicas, que en el ser humano está relacionada con una enfermedad renal conocida como la nefropatía endémica de los Balcanes.

De acuerdo a estadísticas de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia este producto es el de mayor consumo a nivel nacional.

La Unión Europea ha establecido límites máximos para la OTA en el café soluble de 10 ppb (partes por billón) y en el café tostado de 5 ppb, desde el año 2001 en Colombia la Federación Nacional de Cafeteros de la mano con la Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) desarrollan un proyecto para mejorar la calidad del café y prevenir la formación de mohos con un enfoque hacia las buenas prácticas de higiene y poscosecha, pero no existe regulación nacional que establezca y vigile estos mínimos, limitando a los procesadores de café tostado y soluble a la legislación internacional.

La compañía Cafetal del Río S.A.S busco reducir el contenido de la OTA en el café pasilla de máquinas por medio de la tosti3n, planteando como hipótesis que al menos uno de los tratamientos térmicos disminuya el contenido de OTA en el producto, logrando desarrollar una curva de tosti3n que asegura que el café tostado cumple con el parámetro fijado por la Unión Europea, brindándole a la compañía la oportunidad de exportar los productos al mercado europeo a precios competitivos por el ahorro significativo en costos de materia prima y en análisis de cromatografía o HPLC.

Para seleccionar el lote de café verde tipo pasilla de máquinas, se realizaron mediciones preliminares de OTA durante la recepción de materia prima en donde su contenido de la Ochratoxina A se encontraba en 102,57 µg/kg. Su proceso de tosti3n se realizó en una tostadora Probat tipo Probatone 25 la cual utiliza gas natural como combustible y funciona con el principio de conducción- convección.

1.2. Descripción Del Problema

La compañía Cafetal del Río. S.A.S. ubicada en la ciudad de Ibagué, departamento del Tolima, es una empresa procesadora de café tostado y molido, con ventas cercanas a los 3000 kilos/mes y con una capacidad de producción de 8000 kilos/mes. Con el ánimo aumentar las ventas al 100% de la capacidad productiva y poder entrar al mercado europeo en término de dos años, ha querido de manera voluntaria acoger las

normas que rigen la industria de los alimentos, especialmente las normas que aplican para el proceso del café.

Debido a que la pasilla de máquinas es un subproducto de la trilla del café pergamino, el costo como materia prima es un 40% más bajo en comparación con el café excelso de exportación, siendo los precios más cómodos para el procesador de café local.

El interés actual de la compañía Cafetal del Río. S.A.S. es el de estandarizar el proceso de tosti3n para café tipo pasilla de máquinas contaminada con Ochratoxina A y a través de la evaluación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) determinar el grado de tosti3n que garantice el límite máximo legal. Para esto se utilizara una tostadora tipo Probat con sistema de conducción- convección con capacidad de 25Kg/Bache y un equipo de HPLC Waters con detector de fluorescencia.

Con el ánimo de profundizar en el área de procesos de alimentos y biomateriales, se optimizara y ajustara la variable de temperatura final de tosti3n, evaluando los fenómenos de transporte involucrados en este proceso térmico que actúan directamente en la disminuci3n de la concentraci3n de la Ochratoxina A.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Estandarizar la tosti3n de café tipo pasilla de máquinas a través de cromatografía líquida de alta eficiencia en la procesadora de café Cafetal del Río.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Identificar y ajustar las variables operacionales críticas del proceso de tosti3n que influyen directamente en la reducci3n del contenido de Ochratoxina A en el café.

- Establecer una curva de tosti3n patr3n que garantice la reducci3n de la Ochratoxina A en la pasilla de m3quinas a niveles seguros para su comercializaci3n y consumo.
- Cuantificar el contenido de Ochratoxina A por cromatograf3a l3quida de alta eficiencia en las muestras recolectadas de los diferentes grados de tosti3n en el tambor de enfriamiento.
- Establecer el calor m3nimo necesario para reducir el contenido de la Ochratoxina A, a niveles seguros que cumplan con los l3mites legales establecidos.

1.4. Justificaci3n

Se han realizado numerosos estudios que demuestran que el procedimiento de tostado influye sobre la destrucci3n de la Ochratoxina A (OTA): algunos autores opinan que no se detectan diferencias significativas, inferiores al 12% en lo relativo a la reducci3n de OTA por la operaci3n del tostado, mientras que otros autores afirman que se reduce el contenido de la OTA en torno a un 80%, o incluso valores superiores. Seg3n afirma Blanc (1998): “los niveles de Ochratoxina A se reducen entre un 84-87%, tras realizar maniobras operacionales en los granos de caf3 verde, principalmente tostado, molienda y trituraci3n para obtener caf3 en polvo”.

Los valores de concentraci3n de OTA obtenidos por diferentes autores en caf3 (Tabla 1), muestran que existen muestras, que superan el l3mite m3ximo establecido seg3n legislaci3n vigente (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para caf3 tostado en grano y molido; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para caf3 soluble e instant3neo)/.

Tabla 1. Concentraci3n de Ochratoxina A en el caf3

| CONCENTRACI3N DE OTA EN CAF3 | |
|-------------------------------------|---|
| Tipos de caf3s | Intervalo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) |

| | |
|------------------------------|-----------|
| Granos de café verde | 0,2-7,30 |
| Café tostado y molido | N.D-8,20 |
| Café soluble | N.D-27,20 |

Fuente: Ravelo A, 2011.

Análisis realizados en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia han revelado niveles de casi 200 ppb de Ochratoxina A en muestras de café verde tipo pasilla y niveles de hasta casi 20 ppb en muestras de café soluble. (Díaz, 2005).

La Ochratoxina A (OTA) es una micotoxina neurotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena y teratogénica, está asociada a la enfermedad fatal de los riñones llamada nefropatía endémica de los Balcanes. En habitantes de esta región de Europa se han encontrado concentraciones hasta de 100 nanogramos de OTA/ ml de sangre (Nikolov y Chernozemsky, 1990).

Los niveles de Ochratoxina A están estrechamente relacionados con las condiciones de beneficio, secado, almacenamiento y clasificación del café, por tal motivo se desea iniciar la investigación sobre la estandarización del proceso de tosti3n del café tipo pasilla de máquinas a través de cromatografía líquida de alta eficiencia y tomando como referencia el método oficial AOAC 2004.10 (2005) con el fin de obtener productos con contenidos menores al límite máximo para la OTA establecido por la Unión Europea.

Para la procesadora de café tostado Cafetal del Río S.A.S es importante obtener productos que cumplan con la especificación de la Ochratoxina A para poder ingresar al mercado europeo con precios competitivos y así lograr aumentar las ventas al %100 de la capacidad productiva a un término de dos años, además de garantizar la inocuidad de los productos obtenidos con café tipo pasilla de máquinas y reducir el riesgo a la ingesta de la toxina para los consumidores de café colombiano.

CAPITULO II

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1. Marco De Referencia

Las micotoxinas son compuestos químicos producidos por hongos que contaminan y crecen en distintos sustratos cuando las condiciones ambientales son favorables. Los sustratos a los que colonizan pueden ser cereales, café, frutas y vegetales, por lo tanto su presencia reviste una gran importancia desde el punto de vista agroalimentario.

Las ochratoxinas fueron identificadas por un grupo de investigadores en 1965 en Sudáfrica, en donde se estudiaba la toxicidad de los hongos presentes en cereales. El grupo de investigadores conformado por Van der Merwe KJ, Scott B así como Steyn PS lograron el aislamiento y caracterización de la toxina a partir de cultivos realizados del *Aspergillus Ochraceus* en harina de maíz, de allí deriva su nombre Ochratoxina y abreviado como OTA. Estudios posteriores identificaron la Ochratoxina B y los esteres metílico y etílico de la Ochratoxina A y Ochratoxina B (Steyn y Hosapfel, 1967^a).

De todas las ochratoxinas, la Ochratoxina A es la que aparece más frecuentemente de forma natural, seguida por la Ochratoxina B (OPS-OMS, 1983), siendo la Ochratoxina A la más toxica seguida de la Ochratoxina C debido a las biotransformaciones que experimentan en la sangre (Fuchs R *et al*, 1992). La Ochratoxina A está asociada a la enfermedad fatal de los riñones llamada nefropatía endémica de los Balcanes. En habitantes de esta región de Europa se han encontrado concentraciones hasta de 100 nanogramos de OTA/ ml de sangre (Nikolov y Chernozemsky, 1990).

La Ochratoxina se encontró por primera vez en el café en 1974 por Levi *et al*. Desde entonces se han realizado múltiples estudios sobre su ocurrencia y métodos de

determinación debido a que la contaminación por OTA no se detecta por la apariencia del grano de café o por el sabor o aroma de la bebida preparada, por lo tanto se requieren de técnicas analíticas para su determinación.

En 1997 Cenicafé (Centro Nacional de investigaciones de Café) comenzó los estudios sobre la Ochratoxina A en el café verde y tostado en el cual se evaluó el efecto de la tostación sobre la OTA contaminando de manera intencional con cantidades conocidas de OTA a granos de café almendra, los cuales después del proceso de tostado presentaron Ochratoxina A con una reducción del 20 al 30% (Puerta G et al, 1997).

Debido a las inconsistencias encontradas en la literatura sobre la influencia de la operación de tostión de los granos de café sobre el contenido de Ochratoxina A, en 1998 Blanc M *et al* encontró, tras una investigación en una fábrica de café soluble, que el contenido de OTA presente de forma natural en el café disminuyó de manera significativa en el proceso de tostión de tal manera que el café tostado y molido contenía solo el 16% de la OTA presente originalmente en el café verde.

En el año 2003 Romani S *et al* realizó una investigación en la que concluyó que el grado de tostión influye en la reducción de la OTA de tal manera que las mejores condiciones encontradas fueron las de café oscuro, obteniendo muestras de café tostado con contenidos de OTA con una eliminación mayor al 90% frente a los de la materia prima y demostrando así unos resultados consistentes a los de Maurice Blanc.

En el año 2005 Suarez M *et al* evaluó no solamente los diferentes grados de tostión sino también diferentes maneras de preparación de la bebida, encontrando resultados consistentes con Blanc y Romani y además encontrando que la preparación de café tipo espresso presentaba un contenido de OTA menor en comparación a las preparaciones por Filtro y por embolo, debido a que el agua caliente duraba menor tiempo en contacto con la muestra

La Unión Europea considero que el riesgo de las micotoxinas es tan elevado a largo plazo que estableció en el año 2004 límites máximos admisibles para la OTA de 5 ppb en el café tostado y de 10 ppb en el café instantáneo (Rodriguez J, 2012).

2.2. Las Micotoxinas

Las micotoxinas, que deriva de las palabras griegas mikes y toxina, que significan hongos y veneno respectivamente son metabolitos secundarios producidos por algunas especies de hongos, que incluye setas, mohos y levaduras, y que pueden afectar la salud de las personas y los animales. Estas pueden contaminar varios productos de alimentación humana y animal (Soriano, 2007)

Las micotoxinas representan un peligro latente tanto para la salud humana como animal, estas se pueden encontrar de modo natural en un gran número de productos agrícolas, utilizados como materias primas para la preparación de alimentos balanceados para animales, y como contaminantes o residuos tóxicos de los productos de las explotaciones zootécnicas (leche, huevos y carnes). La contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración hasta su conservación. (Camean, 2006)

Las micotoxinas más estudiadas y con acción conocida en mamíferos y peces son: aflatoxinas, ochratoxinas, patulina, ácido penicilínico, citrinina, zearanelona, alcaloides de ergot, y tricotecenos. En la tabla No 2 se resume los principales metabolitos tóxicos producidos por hongos comunes en la contaminación de los alimentos. (Castro, 1994)

Tabla 2. Principales metabolitos tóxicos producidos por hongos contaminantes de los alimentos.

| HONGOS | PRINCIPAL METABOLITO TÓXICO |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| Aspergillus flavus | Aflatoxinas B, M, G; ácido kojico |
| A. parasiticus | Aflatoxinas B, M |
| A. ochraceus | Ocratoxina A |
| Fusarium tricenectum | T-2 toxina |
| F. roseum | T-2 toxina |
| F. moniliforme | Zearalenona (F-2 toxina) |
| Gilerella zeac | 2-Deoxinivalenol (Don) |
| Penicillium viridicatum | Ocratoxina A |
| P. vyclopium | Ocratoxina A |

Fuente: FAO (2009)

La imposibilidad de clasificar a estos compuestos en forma simple, ha llevado a considerar formas de clasificación que consideran aspectos más refinados tales como, mecanismos moleculares o activación biológica. (Castro, 1994)

2.2.1. La Ochratoxina A.

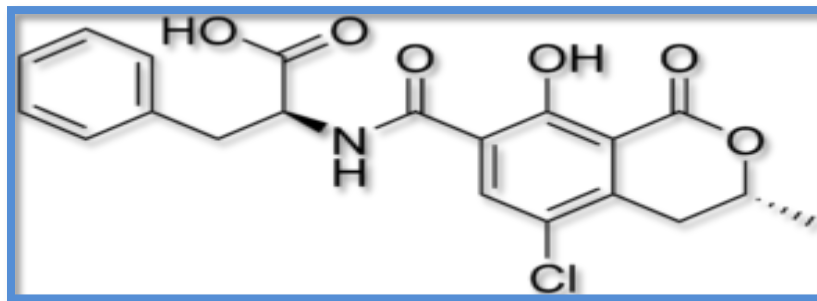
Las ochratoxinas son producidas por varias especies de hongos (o mohos) filamentosos, en especial por *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos hongos son ubicuos y su potencial de contaminación, tanto en productos alimenticios como en alimentos para animales, es muy alto. La Ochratoxina A, el compuesto principal, se ha encontrado en más de 10 países, entre ellos Europa y Estados Unidos. La Ochratoxina producida por *Aspergillus* parece estar limitada por condiciones de alta humedad y temperatura. Sin embargo, algunas especies de *Penicillium* pueden producir Ochratoxina A en temperaturas menores de los 5°C.

Desde hace mucho se sabe que la OTA es una potente nefrotoxina, teratógeno y carcinógeno. Se ha asociado a la etiología de la nefropatía endémica de los Balcanes,

una enfermedad letal del riñón humano común en ciertas zonas de los Balcanes y circunscrita a las mismas. En los últimos 10 años algunos estudios han indicado que la modalidad de carcinogenicidad de la OTA es genotóxica. Con todo, no hay seguridad sobre la genotoxicidad de la OTA y la investigación reciente financiada por la DG XII de la UE ha demostrado que el enlace del ADN de la OTA no se percibe con métodos analíticos sensibles, y que es poco probable que represente un mecanismo de formación de tumores a través de la OTA. (FAO)

Su molécula de estructura compleja (Figura No.1) es pequeña y soluble en agua, y es una combinación de un aminoácido (fenilalanina) y un policétido al carbono 10 (del metabolismo de las grasas). Contiene un átomo de cloro necesario para su actividad biológica. Es estable en el calor y se extrae fácilmente del café molido con agua caliente. (FAO)

Figura 1. Estructura química de la Ochratoxina A (OTA).



Fuente: Wikipedia

2.2.2. Toxicidad de la Ochratoxina A.

De acuerdo a la comisión internacional para la evaluación de riesgos por exposición a micotoxinas, la Ochratoxina A, presenta alta toxicidad. Por lo tanto, estableció provisionalmente que el límite máximo tolerable a la Ochratoxina A en los seres humanos sería 112 ng/ Kg/ Semana. Esta conclusión se basó en el nivel máximo de Ochratoxina tolerable para los cerdos, sin deterioro de la función renal, que es de

0.008 mg/ Kg de peso corporal por día, lo que corresponde a 0.2 mg de toxina por Kg de ración. (Mallmann, 2007)

La Ochratoxina A produce dos tipos de toxicidad: (Soriano, 2007)

1. Toxicidad aguda

2. Toxicidad crónica

- *Toxicidad aguda.* Es relativamente baja y muestra variaciones interespecíficas, la DL50 por vía oral se encuentra en un intervalo entre aproximadamente 20 y 50 mg/ Kg en ratas y ratones, y de 0.2- 1 mg/ Kg en perros, cerdos y pollos, que son las especies más sensibles. Los síntomas de la intoxicación aguda consisten en hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fimbria en bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón, así como nefrosis y necrosis hepática y en el tejido linfoide. Existe descrito únicamente un caso de intoxicación aguda en el ser humano. (Soriano, 2007)

- *Toxicidad crónica.* Lo que más preocupa respecto de la Ochratoxina A son sus efectos crónicos, está demostrado que el consumo crónico de Ochratoxina A produce una nefropatía intersticial en los animales de granja como pollos y cerdos, que puede causar grandes pérdidas económicas. A pesar de las diferencias en cuanto a la toxicocinética en diversas especies, las lesiones renales, en cerdos, en aves y en roedores son muy similares. (Soriano, 2007)

Tabla 3. Principales efectos de la toxicidad crónica de la OTA.

| Toxicidad | EFFECTOS | PATOLOGIAS |
|-------------------|---------------|--|
| crónica de OTA | Nefrotóxicos | Algunos estudios realizados en Francia, Túnez y Egipto indican una relación entre la ingesta de OTA a través de la dieta y el desarrollo de tumores renales. |
| | Teratogénicos | La OTA está clasificada por la IARC (Agencia Internacional de |

| | | |
|--|-------------|--|
| | | Investigación del Cáncer) como posible carcinógeno humano clase 2B ya que produce tumores renales en animales de experimentación. |
| | Genotóxicos | Algunos autores utilizando la técnica de post-marcaje con P, observaron que esta micotoxina incrementaba la formación de aductos en el DNA. Además, la formación de aductos estaba correlacionada con la formación de tumores. |

Fuente: Soriano (2007)

2.2.3. La Ochratoxina A y el café.

La unión Europea (UE) estableció en el 2004 un límite máximo de 5 µg/ Kg de OTA en el café tostado y molido y de 10 µg/ Kg en el café instantáneo, límites máximos que fueron ratificados en el 2005-2006, y que se mantienen en la actualidad. La Unión Europea ha considerado que el riesgo de las micotoxinas es tan elevado a largo plazo que es necesaria una regulación específica a reducir su ingestión. (Rodríguez, 2012).

La presencia de OTA en el café verde muestra una incidencia que varía desde el 56 al 100% en un rango de concentración que oscila entre 0,2 y 360 ng/g (Noonim *et al.*, 2008).

Según el informe de C.E. (2002) el café contribuye en un 10% al promedio total de la ingesta diaria de OTA en la Unión Europea

El problema de la Ochratoxina se ha trasladado a los países productores, puesto que ahora se les exige, sin retraso, una mejora en los sistemas productivos que impida la proliferación de los hongos en el café verde. Estas medidas higiénicas suponen un compromiso al desarrollo para muchos países. Así, el límite que se ha establecido de 5 ppb implicaría un rechazo del 7% de las importaciones de café verde, casi el total de los beneficios de la comercialización de este producto, lo que indudablemente implica poner en compromiso el desarrollo de esos países. (Rodríguez, 2012)

La formación de la micotoxina se produce cuando hay un agotamiento de los nutrientes en el producto y se comienza a ver la formación del sistema reproductivo del hongo, es decir, la parte visible de la colonia, que parece una agrupación con filamentos que recuerdan al algodón. (Rodríguez, 2012)

Históricamente, y antes de la norma de la Comisión del 2006 (CE) No. 1881/2006, en Europa algunos gobiernos han establecido niveles máximos para la OTA en el café tostado, soluble y, en algunos casos, café verde. Se proporcionan los detalles en la tabla No. 4. (FAO)

Tabla 4. Límites para la OTA en el café ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) vigentes en algunos países europeos.

| | <i>Verde</i> | <i>Tostado</i> | <i>Instantáneo</i> |
|------------------------|--------------|----------------|--------------------|
| Alemania | - | 3 | 6 |
| República Checa | 10 | 10 | 10 |
| España | 8 | 4 | 4 |
| Finlandia | 5 | 5 | 5 |
| Grecia | 20 | - | - |
| Hungría | 15 | 10 | 10 |
| Italia | 8 | 4 | 4 |
| Países Bajos | - | 10 | 10 |
| Portugal | 8 | 4 | 4 |
| Suiza | 5 | 5 | 5 |

Fuente: FAO 2009

Las condiciones que favorecen la producción de la OTA en el café son:

- Daños mecánicos y de insectos en el grano.
- Contaminación del café con los hongos toxigénicos a través de residuos y materiales contaminados como por ejemplo pulpa y granos deteriorados.
- Almacenamiento inadecuado de lotes con humedad mayor al 12%, en sitios no ventilados, con temperatura mayor a 23°C y humedad relativa al 80%.
- Rehumedecimiento y contaminación de los granos de café durante el transporte

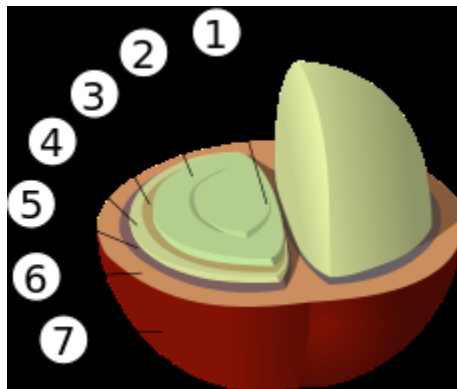
- Las condiciones óptimas de crecimiento del hongo son de 24 a 31°C, valores de actividad de agua entre 0,95 y 0,99 y pH entre 3 y 10. Por otra parte, la Ochratoxina A es producida por el *Aspergillus Ochraceus* aun para valores de actividad de agua entre 0,83 y 0,87 (Frisvad *et al*, 1991).

2.3. El Café

2.3.1. Origen y botánica del café.

El fruto de cafeto tiene la apariencia de una cereza pequeña. Cuando nace es de color verde y durante los once meses siguientes, según la especie y la zona de cultivo y maduración, pasa por las distintas tonalidades que van del amarillo al rojo. En el interior de cada cereza hay dos semillas separadas por un surco y rodeadas de una pulpa amarilla. Los granos de café están protegidos por una película plateada y recubiertos por una pielecilla de color amarillo llamada tegumento o pergamino. (Federación española del café, 2012)

Figura 2. Estructura del fruto y del grano de un cafeto



Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Caf%C3%A9>

Estructura del fruto y del grano de un cafeto: 1: corte central 2: grano de café (endospermo) 3: piel plateada (tegumento) 4: pergamino (endocarpio) 5: capa de pectina 6: pulpa (mesocarpio) 7: piel exterior (epicarpio).

2.3.2. Beneficio del café.

El beneficio del café es el procedimiento para obtener el denominado café oro a partir de las cerezas maduras. Esta es una labor tan importante como cualquiera de las otras que requiere el cultivo; pues todo el esfuerzo, labores e inversión realizados por el caficultor, durante todo el año para conseguir un buen rendimiento, podrían perderse sino realiza un correcto beneficio del grano. (Duicela, 2001)

En la actualidad se reconocen, fundamentalmente, dos métodos de beneficio, identificados como: por la vía húmeda y por la vía seca. (Duicela, 2001)

- *El beneficio por vía húmeda.* El café cereza cosechado deber ser despulpado inmediatamente, si se amontona y demora el despulpado se produce una alteración en la fermentación, se modifica su perfil de taza y puede favorecer la colonización de hongos micotóxicos. (Duicela, 2005)

La separación de los frutos secos, así como de las hojas y materias extrañas, antes de realizar el despulpado, es una práctica necesaria para facilitar el beneficiado y reducir los riesgos por contaminación por hongos y micotoxinas, especialmente de la Ochratoxina A. (Duicela, 2005)

El beneficio por vía húmeda se inicia con una recolección de acuerdo con el tamaño y grado de madurez. Luego las cerezas son sometidas a una operación tecnológica conocida como despulpado; en donde se remueve mecánicamente el exocarpio y en cuanto sea posible el mesocarpio. (Riaño, 2010)

El siguiente estado es conocido como fermentación, en donde se elimina el mucílago que generalmente permanece adherido al endocarpio (pergamino); y es retirado por fermentación enzimática, llevado a cabo en tanques de concreto, seguida de un lavado. Este proceso demora cerca de 72 horas. La fermentación es completa cuando los granos dejan de deslizarse fácilmente entre los dedos dejando una

sensación áspera ligera. Entonces los granos están listos para ser lavados completamente con agua limpia y seguir a la etapa de secado. (Riaño, 2010)

El beneficio por vía seca. Este procesamiento es más directo y de pronto más económico que el anterior generalmente la recolección del café en cereza se realiza desprendiendo el racimo completo en vez de seleccionar individualmente los granos aptos para ser cosechados diferente al procesamiento por vía húmeda utilizado en Colombia.

Procedimiento en el cual hojas, ramas, granos inmaduros, granos deteriorados; materiales no deseados acompañan a los granos cosechados, son llevados a patios de concreto para ser secados al sol; formando capas de 5 centímetros de espesor, las cuales son removidas y giradas varias veces al día para hacer eficiente el secado. Generalmente toma entre tres y cuatro semanas reducir el contenido de la humedad del grano hasta el 12 %, quedando el grano listo para las siguientes etapas. (Riaño, 2010)

2.3.3. Café verde pasilla de máquinas

- *Definición.* Según la Norma Técnica Colombiana NTC 3633 de 1999 el café pasilla es el producto de la trilla del café que se caracteriza por ser una grano no apto como excelso de exportación y que tiene un tamaño de grano superior a 4,76 mm (12/64 de pulgada).
- *Características específicas.* El café pasilla debe cumplir con los requisitos indicados en la tabla 5.

Tabla 5. Requisitos para café verde pasilla

| Característica | Mínimo | Máximo |
|--------------------|--------|--------|
| Humedad, % | 9,5 | 12 |
| Materia extraña, % | - | 0,5 |

| | | |
|--|-----|-----|
| Impurezas, % | - | 1 |
| Ripio bajo malla No. 12 | - | 3,5 |
| Densidad, (g/L) | 580 | |
| Defectos mayores | | |
| Granos negros y parcialmente negros, % | - | 9 |
| Granos vinagre y parcialmente vinagre, % | - | 8 |
| Granos cardenillo, % | - | 1 |
| Total, % | - | 18 |
| Granos aprovechables, % | 40 | - |

Fuente: NTC 3633

2.4. La Trilla

El proceso de la trilla de café comprende las siguientes etapas: recibo y limpieza de pergamino, trilla, selección granulométrica, selección neumática, selección por color y empaque.

2.4.1. Recibo y limpieza del pergamino

El café pergamino entra al proceso por la zona de descargue y pasa por una etapa previa de limpieza que incluye un monitor que consiste en una malla a través de la cual pasa el café pergamino y en donde quedan retenidas las impurezas tales como palos, hojas y cabuyas ; un imán para separar elementos metálicos como puntillas y tornillos que pueden dañar la maquinaria; y una máquina despedregadora que consiste en un plano inclinado vibratorio que se gradúa de manera que aprovechando la diferencia de densidades entre los elementos extraños tales como piedras y el café, permite la salida de estos por el extremo superior, y del café por el extremo inferior.

2.4.2. Trilla

Después de efectuada la limpieza, el café pasa a la máquina trilladora, que consiste en un eje excéntrico montado entre una carcasa. El café pergamino entra por un lado y es golpeado por el eje excéntrico desintegrándose el pergamino. El café

almendra pasa una segunda vez en lo que se denomina la retrilla. Esto con el objeto de desprender la cutícula la cual es una membrana que se encuentra pegada al grano.

2.4.3 Selección neumática

En esta etapa se aprovecha la diferencia de densidades para continuar con el proceso de separación. En general se consideran que los granos livianos, o de baja densidad, son defectuosos y que por lo tanto deben ser retirados del café para exportación y vendidos para consumo nacional. Estos granos se denominan pasilla de máquinas.

Se utilizan dos tipos de máquinas diferentes. Las primeras son las catadoras que, en esencia, son un soplador en el fondo de una columna. El viento que genera levanta los granos livianos por encima de los granos pesados permitiendo así su separación al pasar por salidas diferentes. Siguen los estiles que son unos palos inclinados vibratorios y por donde sopla aire con el objeto de facilitar el deslizamiento del café por encima. El café entra por el punto más alto y en el recorrido hacia la parte baja se va separando entre el más denso y el más liviano. Normalmente se separa en tres flujos, la cabeza que son los granos que se consideran como aceptados, la cola que son los rechazados, y uno intermedio que se recircula por la misma máquina u otra similar dedicada a los repasos. La selección neumática se puede realizar por dos sistemas: el sistema tradicional y el sistema por bloques.

2.4.4 Selección por color

Finalmente se selecciona el café por color, utilizando máquinas electrónicas seleccionadoras de estas máquinas también se obtiene parte de la pasilla de máquinas.

2.4.5 Empaque

Una vez terminado el proceso de selección, el café se empaca en sacos de 70 kg quedando listo para su exportación.

2.5. La Tostión

Después de las operaciones de beneficio y proceso industrial de la trilla de café, la tostión del café es la operación unitaria más importante en la tecnología del café, siendo la etapa en la cual se fijan y forman químicamente las sustancias o compuestos orgánicos que originan el aroma característico del grano de café; como también las causantes del olor y el sabor de la infusión acuosa o extracto de los granos tostados. El café crudo es calentado uniformemente; el calor se debe aplicar en una forma considerable manteniendo estos en movimiento (por acción mecánica) para asegurar que el calentamiento, los cambios de color, de apariencia y las reacciones fisicoquímicas de los granos sean uniformes hasta el momento en el cual los granos alcanzan la intensidad del color fijado previamente; entonces el grano tostado es enfriado rápidamente por una corriente de aire con o sin la ayuda de agua asperjada; enfriamiento conocido como "quenching". (Riaño, 2010).

En este proceso están asociados los fenómenos de transferencia de calor y transferencia de masa con reacciones químicas; y cuando se utilizan tostadores de lecho fluido intervienen los principios hidrodinámicos de la mecánica de fluidos. (Riaño, 2010)

2.5.1. Fases de la tostión. En la tostión hay cinco fases principales:

- a) Desecación
- b) Crecimiento
- c) Disgregación
- d) Tostado Completo
- e) Enfriamiento

Los primeros cambios se realizan a los 50°C en las capas superficiales, a los 100°C el color verde del café comienza a cambiar a amarillo, en este momento empieza la desecación donde se desprende vapor de agua y comienza la

volatilización desarrollando además un olor a pan tostado. Alrededor de los 120°C a 130°C, el grano adquiere una coloración castaña que varía poco a poco a coloraciones pardas, acompañado de un aumento en el volumen y su olor todavía no es característico. (Prieto, 2002)

Alrededor de los 180°C el olor comienza a ser característico y a causa de la pirolisis aparecen productos gaseosos como vapor de agua, CO₂ y CO, compuestos volátiles por la descomposición de los carbohidratos, proteínas y grasas que son los causantes del aumento del tamaño del grano el cual comienza a tomar una coloración marrón a causa de las reacciones de Maillard y la caramelización de azúcares.

En este momento comienza una fase de descomposición caracterizada por el rompimiento de la estructura celular de los granos debido a sobrepresiones internas (crepitación), producción de humo y la aparición del aroma del café, en este instante las reacciones endotérmicas alcanzan su punto máximo. (Prieto, 2002)

Posteriormente comienzan las reacciones exotérmicas debido al calor de reacción dentro del grano, que hacen que este alcance temperaturas hasta de 200°C aproximadamente. Después de alcanzada la óptima caramelización de azúcares se obtiene la tostación completa en donde desciende el contenido de agua a valores entre 1,5% y 3,5% en peso. (Prieto, 2002)

La zona de tosti3n se encuentra entre los 180°C a 250°C siendo la temperatura 3ptima entre los 210°C y 230°C, por encima de esta ocurre la sobretosti3n en donde se acentúa el desprendimiento de humos, los granos se ennegrecen, el volumen ya no aumenta y en el peor de los casos se carbonizan, se hacen m3s quebradizos y el aroma desaparece. Para detener el proceso de tosti3n del caf3 es necesario generar un enfriamiento r3pido e inmediato de los

granos, ya sea por medio de una corriente de aire o por apagado con aspersión de agua. (Prieto, 2002)

Tabla 6. Cambios que ocurren en el café a distintos grados de calor durante el tostado.

| Temperatura | Cambio |
|---------------------------|--|
| 100° C (212° F) | Coloración verde a amarilla, olor a pan tostado y desprendimiento de vapor de agua. |
| 120°-130° C (248°-266° F) | Coloración castaño que pasa de pardo claro a oscuro. |
| 150° C (302° F) | Despide olor a semillas tostadas sin apreciarse el aroma característico. |
| 180° C (356° F) | El aroma característico del café comienza a desarrollarse. Desprendimiento de CO y CO ₂ . Los gases de combustión aparecen en volutas color blanco azuladas. Los granos adquieren una coloración color marrón y el volumen aumenta. |
| 180°-270° C (356°-518° F) | El aroma es más abundante y el color más oscuro. Hay un aumento mayor en volumen, los granos crepitan y presentan una exudación brillante en la superficie. |
| 270° C (518° F) | El desprendimiento del humo aumenta, los granos se ennegrecen y pierden el brillo; el volumen deja de aumentar. |
| 300° C (572° F) | Granos negros y desmenuzables bajo ligera presión, desaparece el aroma por completo. El café se carboniza. |

Fuente: <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id62.htm>

2.5.2. Cambios químicos durante la tostión

Durante el proceso de tostión se llevan cambios a nivel químico en el grano, estos cambios generan las propiedades organolépticas propias de la infusión. Los cambios químicos más característicos se relacionan en la tabla 7.

Tabla 7. Cambios químicos que ocurren en el café durante el tostado.

| | |
|-------------------------|--|
| Proteínas | Contenidas originalmente en el café verde son influenciadas por el calor y se desnaturalizan y parte de ellas son transformadas en ácidos y carbohidratos. |
| Carbohidratos | Se transforman totalmente por la influencia de la temperatura, donde los azúcares presentes en el café verde desaparecen por completo, debido a la caramelización y a las reacciones de Maillard. La sacarosa inicialmente se deshidrata y luego se hidroliza en azúcares reductores que posteriormente se polimerizan. |
| Grasas y Aceites | Aumentan durante la tosti3n y proporcionan una pequeña cantidad de principios volátiles. Sin embargo bajo la influencia del calor las materias grasas son liberadas, evidenciándose. Esta materia grasa sirve como fijador de diversos principios aromáticos y cuando se solidifican hacen que el grano sea más quebradizo, facilitando la molienda. |
| Ácidos | Subsisten parcialmente tras el tueste, estos se forman principalmente a partir de los carbohidratos y desempeñan un papel importante en el aroma y en el sabor de la bebida. |
| Minerales | Su principal función es la de catalizar las reacciones de pirolisis y se presentan en el grano en forma de sales orgánicas. |

Fuente: Prieto (2002)

2.5.3. Curva de tosti3n

Las curvas de tosti3n o perfiles de tosti3n son gráficas en las cuales se representa la variaci3n de la temperatura del proceso (eje Y) frente al tiempo (eje X), el diseño de la curva o perfil de tosti3n se realiza de acuerdo a las características sensoriales que se quieran resaltar o atenuar del café y también al origen o calidad de la materia prima.

Los maestros cafeteros la llaman la curva S y la dividen en tres etapas básicas: secado de los granos, fase endotérmica y fase exotérmica. En la primera etapa los granos de café ingresan al tambor de tueste, registrando un descenso en la temperatura hasta un punto de inflexión en el cual se da inicio a la segunda etapa. En la fase endotérmica los granos de café absorben la energía suministrada hasta el punto que comienzan a crepitar o primer Pop, momento en el cual comienza la tercera etapa. En la fase exotérmica los granos de café comienzan a liberar dióxido de carbono y sustancias volátiles.

2.6. Cromatografía Líquida De Alta Eficiencia

La cromatografía es un método, usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve. (Quattrocchi, 1992)

Figura 3. Cromatografo líquido.



Fuente: el autor

En la *HPLC isocrática* el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas

con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. (Cromatografía líquida en Wikipedia, 2013)

La HPLC de fase reversa consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con Rme_2SiCl , donde la R es una cadena alquil tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ o C_8H_{17} . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. (Cromatografía líquida en Wikipedia, 2013)

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto fue realizado en las instalaciones de la procesadora de café tostado Cafetal de Río ubicada en la ciudad de Ibagué, departamento del Tolima.

3.1. Materia Prima

Para este proyecto se utilizó café verde tipo Pasilla de Máquinas, proveniente de una trilladora del eje cafetero.

Para seleccionar el lote de café verde tipo pasilla de máquinas, se realizaron mediciones preliminares de OTA durante la recepción de materia prima en donde su contenido de la Ochratoxina A se encontraba en 102,57 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

La materia prima fue muestreada y evaluada previamente por HPLC, con el fin de seleccionar entre los ingresos de café un lote de 500 Kg que estuviera contaminado naturalmente por Ochratoxina A, el muestreo se realizó de acuerdo a la Norma técnica Colombiana NTC ISO 2859.

3.2. Equipos

- Tostadora Probat serie Probatone25
- Colorímetro digital Quantik IR800
- Molino Grindmaster 810
- Balanza Analítica Mettler Toledo AB204 con precisión de 0,1 mg
- Equipo de Extracción en fase solida al vacio J.T BAKER
- Baño Ultrasonido ELMA
- Batidora

- Bomba de vacío Buchi
- Evaporador de muestras Thermo
- Equipo de agua microfiltrada Simplicity Millipore
- Agitador Vortex
- Equipo HPLC Waters con detector de Fluorescencia

3.3. Material De Laboratorio

- Lanza para muestreo
- Tamiz de malla 630 micras
- Embudos de vidrio
- Erlenmeyers de 250 ml
- Pipeteador
- Pipeta Aforada de 20 ml
- Beakers de 50, 250 y 600 ml
- Jeringas plásticas de 10 y 60 ml
- Balones aforados de 1000 ml
- Sistema de filtración de solventes Millipore
- Viales o tubos de ensayo con fondo cónico de 5 ml
- Viales para HPLC de 1 ml
- Papel filtro S &S 589-3
- Papel filtro de cafetera de goteo
- Filtro de membrana de 0,45 μm de poro Millipore
- Columna cromatográfica Spherisorb 5 μm ODS2 4.6 * 250 mm

3.4. Reactivos

- Agua Tipo I
- Bicarbonato de sodio

- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Ácido Acético
- Columnas de inmunoafinidad R-BIOPHARM
- Cloruro de Potasio
- Cloruro de Sodio
- Dihidrógeno de Potasio Anhidro
- Hidrogeno Fosfato Disódico Anhidro
- Nitrógeno
- Tolueno
- Dichlorodimethyl-silane
- Estándar de Ochratoxina A 10 ppm de Micotox.

3.5. Metodología

3.5.1. Tostión.

La tostión de las muestras de café se realizó en una tostadora Probat serie Probatone 25 con capacidad para 15 Kg de café verde por cada bache, con quemador a gas natural. Para establecer el grado de tostión se fijaron los parámetros de la tabla 8, en donde varia la temperatura final del proceso y el factor tiempo se fija como una constante.

Tabla 8. Condiciones de tostión

| GRADO DE TOSTIÓN | TEMPERATURA °C | TIEMPO DE TOSTIÓN min | REPLICAS |
|------------------|----------------|--------------------------|----------|
| Claro | 180 | 13 | 3 |
| Medio | 200 | 13 | 3 |
| Oscuro | 220 | 13 | 3 |
| Muy Oscuro | 240 | 13 | 3 |

Fuente: El autor

Para cada tratamiento se realizó seis tostiones, las primeras tres tostiones de cada tratamiento se rechazaron por ajustes y acondicionamiento del equipo para alcanzar las temperaturas seleccionadas. La recolección de muestras para análisis de OTA por HPLC y de datos de las curvas de tostión se realizó en las siguientes tres tostiones.

De cada bache aceptado se tomaron tres muestras para analizar el contenido de OTA.

3.5.2. Molienda.

Se realizó una molienda fina a las muestras obtenidas utilizando un molino Grindmaster 810. La muestra molida se pasó por un tamiz de malla de 630 micras para homogenizar la granulometría de las muestras.

3.5.3. Análisis de Ochratoxina A.

Los análisis de OTA se realizaron antes de tostar y después de tostar, se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia tomando como referencia el método oficial AOAC 2004.10 (2005). El procedimiento se describe a continuación:

a) Café verde

- *Extracción.* Se pesaron 10 gramos de café verde finamente molido y pasados por un tamiz de 630 micras, luego se adicionaron 100 ml de bicarbonato de sodio al 1% en agua, después se homogenizó durante 2 minutos con la batidora a alta velocidad y se filtraron a través de papel filtro S&S 589-3, se tomó una alícuota de 20 ml del filtrado y se diluyeron con 20 ml de PBS (Solución buffer de sales de fosfato).
- *Limpieza.* Se acondicionó el sistema de filtración en fase sólida J.T Baker con la columna de inmunoafinidad R-Biopharm y se le empato la jeringa de 60 ml y se pasaron los 40 ml del extracto diluido a un flujo máximo de 3 ml/min, después se adicionaron 20 ml de agua para lavar la columna a un flujo aproximado de 5 ml/min,

después se secó la columna con ayuda de vacío y se eluyó la Ochratoxina A con 2 ml de Metanol en un vial con fondo cónico. El eluato se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a 40 °C, y el residuo se volvió a disolver en 1 ml de fase móvil y se homogenizó en el agitador Vortex y luego fue filtrado en un filtro descartable de 0,45 µm sobre un vial de 1 ml.

- *Condiciones cromatográficas.* Se acondicionó el equipo HPLC con una columna de Spherisorb con tamaño de partícula de 5µm ODS2 4.6 * 250 mm a una temperatura de 30°C con una mezcla isocrática de fase móvil compuesta por Metanol, Acetonitrilo, Agua y Ácido Acético (35:35: 29:1) a un flujo de 0,8 ml/min, con un detector de fluorescencia y funcionando a una longitud de onda de excitación de 330 nm y una longitud de onda de emisión de 475 nm y un volumen de inyección de 50µl.

El cromatógrafo líquido utilizado fue un Waters con un sistema de bombas binarias serie 1500, un inyector automático serie 717+ y un detector de fluorescencia serie 2475 y comandado a través del software Breeze versión 3.20.

La cuantificación se realizó por comparación con una curva de calibración realizada previamente a partir de un patrón externo de Micotox de 10 mg/L y usando la siguiente fórmula:

$$\text{OTA (ng/g ó } \mu\text{g/Kg)} = m_a * (V_3 / V_4) * (V_1 / V_2) * 1000 / m_s * 1 / 1000$$

Dónde:

Ma = contenido de OTA pasado por la columna cromatográfica (Dato interpolado a través de la curva de calibración)

V1 = Volumen de solución extractora (Bicarbonato de Sodio a 1%)

V2 = Alícuota pasada por la columna de inmutioafinidad

V3 = Volumen final del extracto de OTA listo para inyectar

V4 = Volumen de inyección

Ms = Masa de la muestra (Café verde 10 gramos y café tostado 5 gramos)

b) Café Tostado

Se pesaron 5 gramos de café tostado finamente molido y pasados por un tamiz de 630 micras, luego se adicionaron 100 ml de bicarbonato de sodio al 1% en agua, después se homogenizó durante 2 minutos con la batidora a alta velocidad y se filtraron a través de papel filtro para cafetera de goteo y luego el filtrado se volvió a pasar a través de papel filtro S&S 589-3, se tomó una alícuota de 20 ml del filtrado y se diluyeron con 20 ml de PBS (Solución buffer de sales de fosfato).

El procedimiento de limpieza de la muestra de café tostado se realizó de la misma forma que para el café verde.

3.5.4. Análisis estadístico.

Cada muestra obtenida se analizó por triplicado, se tabularon los resultados obtenidos de Ochratoxina A por HPLC de cada uno de los tratamientos a los que fue sometido el café, se realizó el análisis de varianza y el test de la mínima diferencia significativa con un nivel de significancia de 0,05 utilizando hojas de cálculo de Excel de Microsoft Office 2007.

3.6. Resultados Y Discusión

MATERIA PRIMA

Se seleccionó un lote de café verde tipo pasilla de máquinas que cumplió con las especificaciones o requisitos físicos y sensoriales de la Norma Técnica Colombiana 3633, la cuantificación de la OTA se realizó por triplicado de una muestra representativa

con el fin garantizar la confiabilidad del resultado. En la tabla 9 se encuentran los resultados del café verde.

Tabla 9. Caracterización del contenido inicial de OTA en Pasilla de máquinas

| CAFÉ VERDE | OTA, ppb |
|----------------------------|-----------------|
| Replica 1 | 102,63 |
| Replica 2 | 101,65 |
| Replica 3 | 103,44 |
| Media | 102,57 |
| Desviación estándar | 0,90 |
| RSD | 0,87% |

Fuente: El autor

CURVAS DE TOSTIÓN

Para realizar las curvas de tostión de cada tratamiento a los cuales fue sometido el café verde, se registró cada 30 segundos la temperatura interna del tambor de tueste desde el momento en que se alimenta la tostadora hasta la temperatura final programada y un tiempo de 13 minutos.

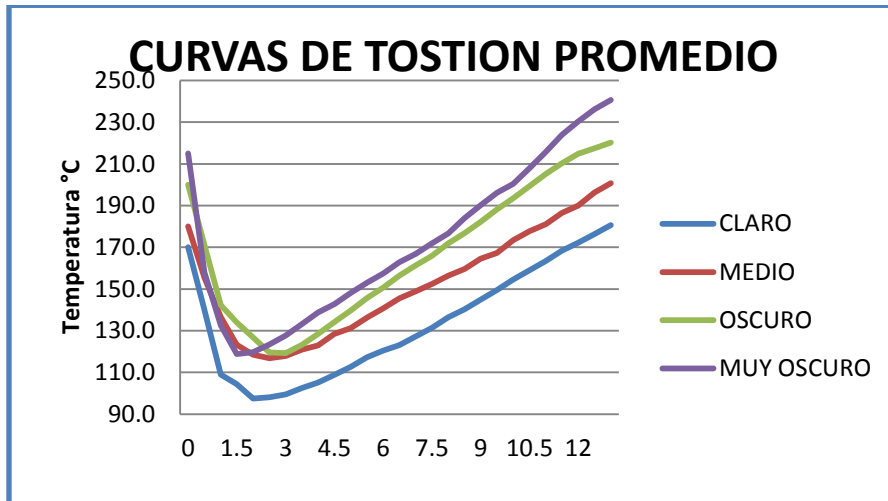
Para obtener un color claro en el grano de café se programó la tostadora para que ingresara el bache de café verde a una temperatura de 170 °C e interrumpiera el proceso de tostión a 180°C con un quenching de 2 litros de agua.

Para obtener un color medio en el grano de café se programó la tostadora para que ingresara el bache de café verde a una temperatura de 180 °C e interrumpiera el proceso de tostión a 200°C con un quenching de 2 litros de agua.

Para obtener un color oscuro en el grano de café se programó la tostadora para que ingresara el bache de café verde a una temperatura de 200 °C e interrumpiera el proceso de tostión a 220°C con un quenching de 2 litros de agua.

Para obtener un color muy oscuro en el grano de café se programó la tostadora para que ingresara el bache de café verde a una temperatura de 215 °C e interrumpiera el proceso de tuestión a 240°C con un quenching de 2 litros de agua. El promedio del monitoreo de las lecturas registradas cada 30 segundos se pueden ver en la figura 4

Figura 4. Curvas de tuestión promedio



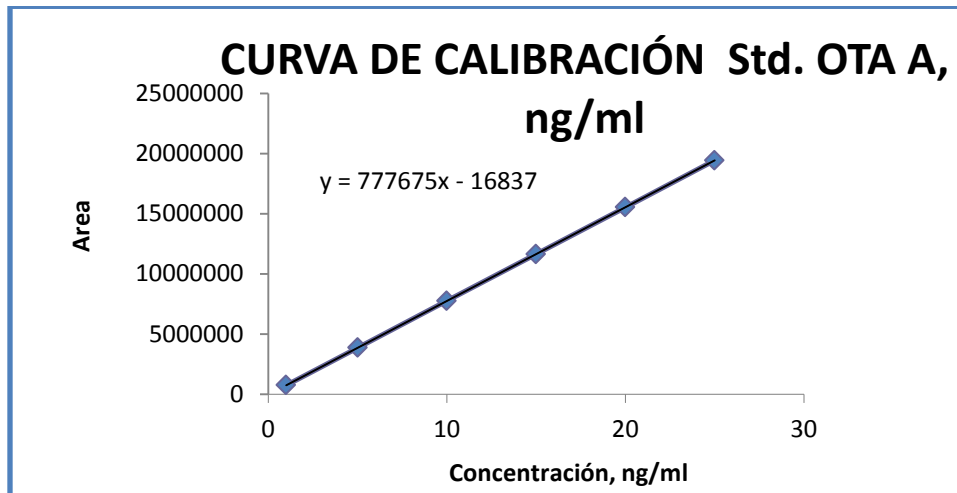
Fuente: El autor

3.7. Análisis De Ochratoxina A Por HPLC

3.7.1. Curva de calibración.

Se preparó una curva de calibración de seis niveles a partir del estándar externo certificado de Micotox de Ochratoxina A de 10 ppm. Los niveles de la curva de calibración fueron de 1, 5, 10, 15, 20 y 25 ppb, a partir de esta curva de calibración y de los datos obtenidos del pico de interés del cromatograma de cada una de las muestras inyectadas se realizaron todos los cálculos para determinar el contenido de OTA de las muestras de café.

Figura 5. Curva de calibración de OTA



Fuente: El autor

En los resultados promediados de cada uno de los tratamientos térmicos aplicados a la pasilla de máquinas se observa que el contenido de OTA disminuye drásticamente a medida que aumenta el grado de tostión.

Tabla 10. Contenido de Ochratoxina A en el café tostado

| GRADO DE TOSTIÓN | OTA, $\mu\text{g/Kg}$ |
|------------------|-----------------------|
| CLARO | 21,8063 |
| MEDIO | 12,3466 |
| OSCURO | 3,5739 |
| MUY OSCURO | 1,0587 |

Fuente: El autor

3.8. Análisis De Varianza

Una vez terminados los análisis de Ochratoxina A se procedió a realizar el análisis de varianza para realizar la verificación de la hipótesis con un nivel de confianza del 95%.

Planteamiento de las hipótesis:

- Hipótesis nula: Ninguno de los tratamientos de tosti3n produce una disminuci3n significativa en el contenido de Ochratoxina A por debajo del punto m3ximo permisible para caf3 tostado (5ppb).

$$\bullet \text{ Ho: } \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4$$

- Hip3tesis alterna: Al menos uno de los tratamientos de tosti3n produce una disminuci3n significativa en el contenido de Ochratoxina A por debajo del punto m3ximo permisible para caf3 tostado (5ppb).

$$\text{Ha : } \tau_1 \neq \tau_j \text{ para alg3n } i \neq j$$

Tabla 11. An3lisis de varianza

| Fuente | GDL | Suma de los cuadrados | Media de los cuadrados | F | Fo | Pr |
|------------------------|-----|-----------------------|------------------------|---------|------|----------|
| Temperatura | 3 | 2391,92 | 797,31 | 6351,07 | 2,90 | < 0,0001 |
| Error | 32 | 4,02 | 0,13 | | | |
| Total corregido | 35 | 2395,94 | | | | |

Fuente: El autor

Debido a que el estadístico F calculado es mayor que el estadístico F tabulado se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, aunque es clara la diferencia significativa que existe entre los tratamientos se corrieron los contrastes de los tratamientos con el test de Fisher de la Diferencia Míxima Significativa.

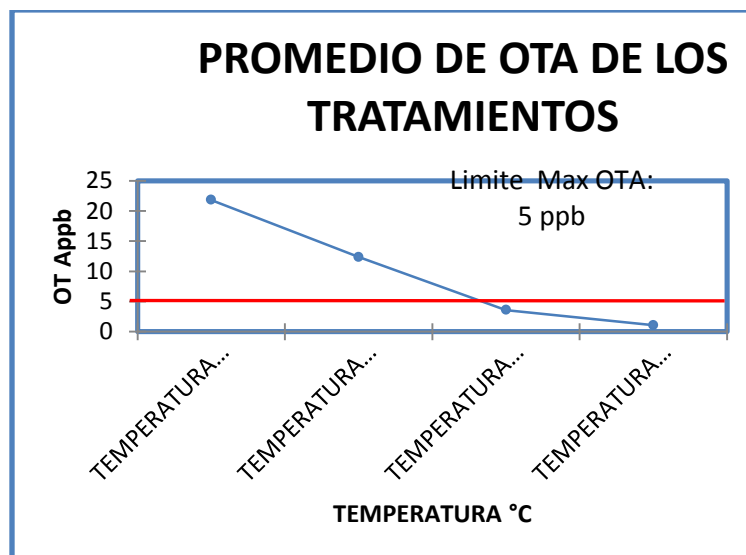
Tabla 12. Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%

| Contraste | Diferencia | Valor crítico | Significativo |
|------------|------------|---------------|---------------|
| 180 vs 240 | 20,748 | 2,037 | Si |
| 180 vs 220 | 18,232 | 2,037 | Si |
| 180 vs 200 | 9,460 | 2,037 | Si |
| 200 vs 240 | 11,288 | 2,037 | Si |
| 200 vs 220 | 8,773 | 2,037 | Si |
| 220 vs 240 | 2,515 | 2,037 | Si |

Fuente: El autor

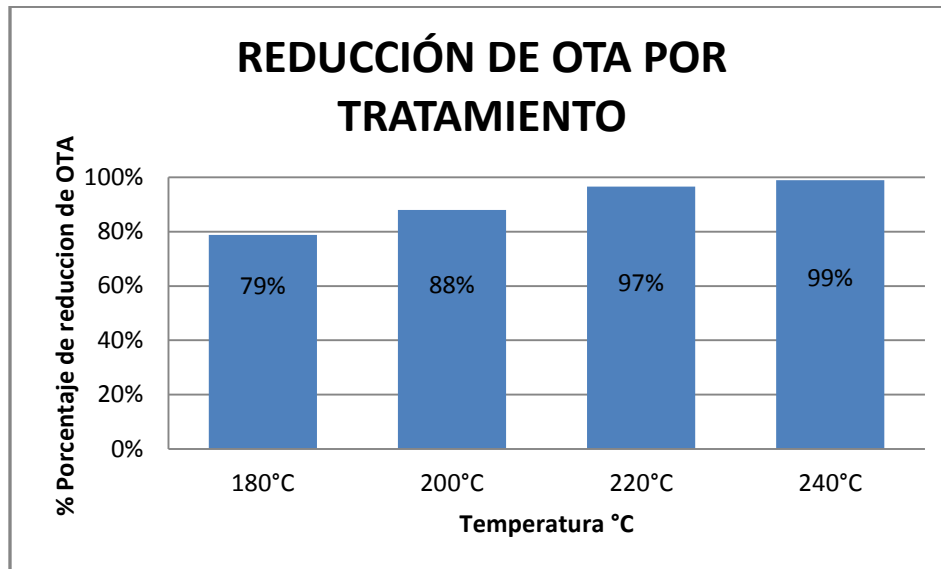
De acuerdo al valor medio de Ochratoxina A de los tratamientos, existen dos tratamientos de tostión que logran disminuir el contenido de la micotoxina hasta un punto que es seguro para su consumo y cumplen con la especificación establecida por la FAO de máximo 5 ppb logrando así una reducción mayor del 95% sobre el contenido inicial del café verde tipo pasilla de máquinas.

Figura 6. Grafica de las medias de los tratamientos



Fuente: El autor

Figura 7. Porcentaje de reducción de OTA frente a la materia prima



Fuente: El autor

3.9. Cálculo del Calor Necesario para Reducir la OTA a Niveles Seguros

Con el propósito de calcular la energía mínima necesaria para reducir el contenido de Ochratoxina A del café verde tipo pasilla de máquinas por debajo del límite máximo permitido en la producción de café tostado, se estableció como base de cálculo un ciclo de tuestión, para el cual se alimentó la tostadora con 15 Kg de café verde y se estimó un consumo de gas natural de 1,0 m³ aproximadamente durante la producción del café tostado de color muy oscuro.

Con el equipo operando de manera estable se establece que el calor generado por el combustible es utilizado en la tuestión de los granos de café y el resto de calor se pierde en forma de aire caliente, gases de combustión y en los fenómenos de convección y radiación, por lo tanto con esos datos se planteó la siguiente ecuación para realizar el balance general de energía:

$$Q_t = Q_p + Q_{pr} \text{ (Ecuación 1)}$$

En donde:

Q_t = Calor total del proceso

Q_p = Calor perdido en el proceso

Q_{pr} = Calor que se utiliza en el proceso de tostado del grano

Debido a que la energía o calor necesario que interviene en el proceso de tosti3n proviene netamente del combustible empleado, se establece que:

$$Q_t = V_c * VCI_c \text{ (Ecuaci3n 2)}$$

En donde:

Q_t = Calor total del proceso

V_c = Masa del combustible por ciclo de tosti3n

VCI_c = Poder calorífico inferior del gas natural a presi3n constante

Para calcular el calor requerido en el proceso de tosti3n se estableci3 la siguiente ecuaci3n:

$$Q_{pr} = M_{pr} * C_{p_{pr}} (T_{f_{pr}} - T_{i_{pr}}) \text{ (Ecuaci3n 3)}$$

En donde:

Q_{pr} = Calor que se utiliza en el proceso de tostado del grano

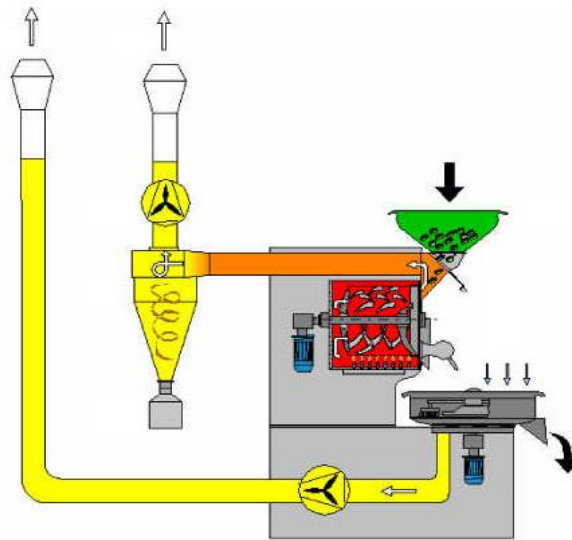
M_{pr} = Masa de caf3 a procesar

$C_{p_{pr}}$ = Calor especfico del caf3 verde

$T_{f_{pr}}$ = Temperatura final del caf3 tostado

$T_{i_{pr}}$ = Temperatura inicial del caf3 verde tipo pasilla de m3quinas

Figura 8. Diagrama de flujos de masa y energía de tostadora Probatone 25



Fuente: www.probatburns.com

Además:

$$VCl_c = 34\,352,7 \text{ KJ/m}^3$$

$$V_c = 1,0 \text{ m}^3$$

$$CP (\text{café verde}) = 1,25604 \text{ KJ/ Kg K (Barreiro, 2006)}$$

Resolviendo:

Calor total del proceso

$$Q_t = (1,0 \text{ m}^3) (34352,7 \text{ KJ/m}^3)$$

$$Q_t = 34\,352,7 \text{ KJ}$$

Calor que se utiliza para tostar el bache de café:

$$Q_{pr} = 15\text{Kg} * 1,25604 \text{ KJ/ Kg K} (513\text{K} - 303\text{K})$$

$$Q_{pr} = 3956,53 \text{ KJ}$$

Calor perdido:

$$Q_p = 34\,352,7 \text{ KJ} - 3956,53 \text{ KJ}$$

$$Q_p = 30\,396,2 \text{ KJ}$$

Eficiencia del proceso de tosti3n:

$$E = (3956,53 \text{ KJ} / 34\ 352,7 \text{ KJ}) * 100$$

$$E = 11,5 \%$$

De acuerdo a los resultados tan solo el 11,5 % de la energa total generada por el combustible se utiliza en la tosti3n del grano y en la reducci3n de la Ochratoxina A, el resto de energa se pierde en forma de emisi3n de vapor de agua, compuestos volátiles, di3xido de carbono, aire caliente y de una manera menos significativa las p3rdidas al medio ambiente por las superficies y conductos por los fen3menos de convecci3n y radiaci3n, aunque el consumo energ3tico es muy alto, se asegura la conformidad del producto final, disminuyendo el contenido de la toxina en m3s del 95% del contenido original presente en la materia prima, lo cual demuestra unos resultados consistentes frente a investigaciones anteriores como las realizadas por Blanc M y adem3s indica que son resultados totalmente reproducibles, los cuales podr3n ser utilizados por microempresarios que a3n no cuentan con los recursos necesarios para realizar determinaciones de Ochratoxina A tanto en sus lotes de materias primas como en sus lotes de producto terminado.

CONCLUSIONES

Se estandarizó el proceso de tostión para café tipo pasilla de máquinas por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, logrando el efecto de disminuir el contenido de Ochratoxina A hasta niveles que aseguran el consumo sano de café, evitando riesgos en la salud y cumpliendo con la legislación actual de la Unión Europea para productos de café tostado y molido con un límite máximo permisible de 5 ppb.

Es necesario el uso de métodos analíticos como la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia para la determinación de la Ochratoxina A, debido a que no es posible detectarla por la apariencia del grano o por el aroma o sabor de la bebida.

La temperatura final del proceso de tostión es una variable crítica para la reducción de la Ochratoxina A, debe estar entre los 220°C y los 240°C para garantizar contenidos de la micotoxina por debajo del límite establecido por la Unión Europea.

Las tostiones de grado bajo y medio no son eficientes en la reducción de la Ochratoxina A en café tipo pasilla de máquinas.

Se determinó que la cantidad de calor necesaria para reducir la OTA a niveles seguros requirió un consumo energético de 3956,53 KJ/Kg café verde, cantidad de energía que asegura la conformidad del producto. Es probable que la disminución del contenido de OTA se lleve a cabo por la aplicación de toda esta energía en forma de calor para iniciar los procesos de pirolisis o degradación química de la molécula en los granos contaminados.

RECOMENDACIONES

Se recomienda dar continuidad al proyecto analizando sensorialmente los productos que se obtienen de las dos curvas de tosti3n de grado de tosti3n oscuro y muy oscuro para evaluar los atributos de las bebidas.

Se recomienda que se sigan promoviendo las buenas pr3cticas agr3colas en toda la cadena agroindustrial del caf3 con el fin de evitar al m3ximo la proliferaci3n de hongos que producen la micotoxina.

REFERENCIAS

- BARREIRO, J.; SANDOVAL, AI. (2006). *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*. Editorial Equinoccio. Primera edición. Caracas Venezuela. Pp. 150
- BLANC, M.; POTTET, A. MUNOZ-BOX, R & VIANI, R. (1998). *Behavior of Ochratoxina A during coffee roasting and soluble coffee manufacture*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Pp. 46, 663- 675
- CABAÑES, F. (2000). *Las Micotoxinas emergentes: Introducción*. Iberoamericana (España) (17): 61,62.
- CAMEAN, A. (2006). *Toxicología alimentaria. España*: Ediciones Diaz de Santos. pp. 291, 292, 295, 299, 301.
- C.E. (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states, reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.7., publisher: SCOOP Directorate-General Health and Consumer Protection.
- DÍAZ, G. (2005). *Micotoxinas y micotoxicosis de importancia en salud humana en Colombia*. Bogota, Colombia. Pp 7.
- DUICELA, L.; CORRAL, R; GUAMAN, J. (2005). *Buenas prácticas agrícolas en la caficultura ecuatoriana*. Manta, Ecuador: Impregcol. Pp. 22
- DUICELA, L.; CORRAL, R; GUAMAN, J. (2005). *Calidad física y organoléptica de los cafés robustas ecuatorianos*. Manta, Ecuador: Impregcol. Pp. 8, 37.

- DUICELA, L.; CORRAL, R; CHOEZ, F. (2006). *Normas de producción ecológica de café arábigo y cacao en la región sur de la amazonia ecuatoriana*. Manta, Ecuador: Noegrafic. P. 16.
- DUICELA, L.; CORRAL, R; FERNANDEZ, F. (2001). *Producción de café arábigo: Guía para el caficultor ecuatoriano*. Quito, Ecuador: Artes gráficas Silva. P. 1, 53.
- FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. (1999). *Compendio de Normas de calidad para la exportación de café verde y procesado*. pp. 22-52.
- FRISVAD, J.; SAMSON, R. (1991). *Filamentous fungi in Foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production*. In: Arora D.K; Mukerji K.G.; Marth, E.H. Eds. *Handbook of applied mycology. V.3. Foods and feeds*. New York, Marcel Dekker, p. 31- 68.
- FUCHS R, HULT K (1992) *Ochratoxin A in blood and its pharmacokinetic properties*. *Food and Chemical Toxicology* 30: 201-204.
- LEVI, C.; TRENK, H.; YERANSIAN, J. (1975) *Investigations of mycotoxins relative to coffee*. In: *Colloque Scientifique International sur le Café*, 7. Hamburgo, Juin 9 – 14, 1975. París, ASIC,. P. 287 – 294.
- MALLMANN, C; DIKIN, P. (2007). *Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos*. Santa María, Brasil: Santa María. Pp. 35, 36, 105, 159- 161.
- NOONIM, P., MAHAKARNCHANAKUL, W., NIELSEN, K. F., FRISVAD, J. C., & SAMSON, R. A. (2008). *Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing aspergillus species from coffee beans grown in two regions of Thailand*. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 197-202.

- OPS/OMS (1983). *Criterios de Salud Ambiental 11: Micotoxinas*. Organización Panamericana de la Salud, pág. 99-104, México, D. F.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). *Plan nacional para la prevención de Ochratoxina A (OTA) en el café ecuatoriano*. Quito: FAO. P. 7,11.
- PRIETO, Y. (2002). *Caracterización física del café semitostado*. Tesis de Grado no publicada. Fundación Universidad de América. Bogotá, Colombia.
- PUERTA, G.; ACEVEDO, M.; ARANGO, G. (1999). *Informes de resultados del proyecto cuantificación de 55chratoxina A en café verde y café tostado*. In: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé. Chinchiná. Colombia. Informe anual de actividades de investigación de la Disciplina de Química Industrial, 1997 – 1999. Chinchiná, Cenicafé, p.v.
- QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA DE ANDRIZZI, S.; LABA, R. (1992). *Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica*. Buenos Aires. Artes gráficas Farro S.A. pp. 3
- RAVELO, A; RUBIO, C; GUTIÉRREZ, A; HARDISSON, A. (2011) *La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión*. *Nutrición Hospitalaria*. 26(6):1215-1226
- ROMANI, S.; GAETANO, G.; DALLA, M. *Influence of Roasting Levels on Ochratoxin A Content in Coffee*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51 (17), pp 5168–5171
- RIAÑO, C; HERNÁNDEZ, L. (2010). 213956- *Tecnología del café*. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. pp. 41, 42, 43, 73.

SORIANO, J. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. 1ª. Ed. España. Ediciones Díaz de Santos. pp. 3, 201, 203, 204.

STEYN, P; HOLZAPFEL, C. (1967) a. "Isolation of methyl and ethyl esters of ochratoxinas A and B, metabolites of *Aspergillus Ochraceus* Wilh", Journal of the South African Chemical Institute. Vol. 20, pp 186.

STEYN, P; HOLZAPFEL, C. (1967) b. "The synthesis of ochratoxinas A and B: Metabolites *Aspergillus Ochraceus* Wilh ", Tetrahedron. Vol. 23, pp 4449 – 4461.

SUAREZ, M; DE LOUISE, B; GONZÁLEZ, O; BAREL, M; GUYOT, B; SCHORR, S; PIERRE, J. (2005). *The impact of roasting on the ochratoxin A content of coffee*. *International Journal of Food Science and Technology*. Pp 40, 605–611

VAN DER MERWE, K; STEYN P; FOURIE L, SCOTT B; THERON J (1965). *Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by "Aspergillus ochraceus" wilh*. *Nature* 4976(205): 1112-1113.

WEBGRAFÍA:

1. Café. (2013, 25 de Marzo). En Wikipedia, *la enciclopedia libre*. Recuperado el 02 de Abril de 2013 a las 22:29 de <http://es.wikipedia.org/wiki/Caf%C3%A9>

2. Café Arabo. Café arábica. (2008, 22 de Septiembre). En Café arabo. Recuperado el 04 de Abril de 2013 a las 19:38 de <http://www.cafearabo.com/cafe-historia/arabica>

3. Café Arabo. Café robusta. (2008, 22 de Septiembre). En Café arabo. Recuperado el 04 de Abril de 2013 a las 19:50 de <http://www.cafearabo.com/cafe-historia/robusta>

4. Café de Colombia. El café de Colombia. (2010). En Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Recuperado el 05 de Abril de 2013 a las 17:50 de http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/el_cafe_de_colombia.
5. CASTRO, E.; AHUMADA, F. (1994, Mayo). Micotoxinas – Rol e importancia en nutrición acuícola. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). Recuperado el 14 de Abril de 2013 a las 15:41 de <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S13.htm>
6. Clasificación botánica del cafeto. (2012, 15 de Octubre). Federación española del café. Recuperado el 06 de Abril de 2013 a las 17:24 de, <http://www.federacioncafe.com/Publico/EICafe/EICafeto.asp>
7. Cromatografía líquida. (2013, 09 de Marzo). En *Wikipedia, la enciclopedia libre*. Recuperado el 10 de Abril de 2013 a las 20:46 de http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_l%C3%ADquida
8. Cromatografía líquida de alta eficiencia Cromatografía líquida. (2013, 09 de Abril). En *Wikipedia, la enciclopedia libre*. Recuperado el 10 de Abril de 2013 a las 21:12 de http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_l%C3%ADquida_de_alta_eficacia
9. Monroig, M, (2011, 15 de Noviembre). DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CAFETO, Ecos del café. Recuperado el 05 de Abril de 2013 a las 22:38 de <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id51.htm>
10. La planta de café (2013, 12 de Febrero). En Food -Info. Recuperado el 5 de Abril de 2013 a las 17:19 de <http://www.food-info.net/es/products/coffee/plant.htm>

11. Reducción de la Ocratoxina A en el Café. (2012, 09 de Mayo) ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). Recuperado el 08 de Abril de 2013 a las 18:11 de <http://www.coffee-ota.org/faq.asp?lang=es>

12. RODRÍGUEZ, J. (2012, 25 de Octubre). Café y micotoxinas. En Eroski Consumer. Recuperado el 11 de Abril de 2013 a las 19:13 de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2006/10/11/25267.php>

13. Ocratoxina (2013, 13 de Febrero) WAGENINGEN UNIVERSITY. Recuperado el 14 de Abril de 2013 a las 15:21 de <http://www.food-info.net/es/tox/ochra.htm>

ANEXOS

Anexo A. Perfil de temperaturas de los ciclos de tostión de café color claro

| Tiempo min | Temperatura °C Ciclo 4 | Temperatura °C Ciclo 5 | Temperatura °C Ciclo 6 |
|------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0 | 170 | 170 | 170 |
| 0,5 | 135,7 | 143,2 | 140,9 |
| 1 | 110,3 | 109,4 | 107,1 |
| 1,5 | 106,2 | 103,6 | 103,2 |
| 2 | 98,6 | 97,5 | 96,4 |
| 2,5 | 98,9 | 98,1 | 97,1 |
| 3 | 100,5 | 99,2 | 98,8 |
| 3,5 | 103,7 | 102,4 | 101,6 |
| 4 | 106,9 | 105 | 103,5 |
| 4,5 | 110,4 | 109,3 | 106,9 |
| 5 | 114,2 | 113,4 | 110,3 |
| 5,5 | 118,3 | 117,6 | 115,9 |
| 6 | 121,2 | 120,9 | 119,1 |
| 6,5 | 123,3 | 123,1 | 122,9 |
| 7 | 127,1 | 126,8 | 127,9 |
| 7,5 | 131 | 131,4 | 131,8 |
| 8 | 136,5 | 135,9 | 137 |
| 8,5 | 140,2 | 139,4 | 141,3 |
| 9 | 144,9 | 144,2 | 145,4 |
| 9,5 | 149,5 | 148,7 | 150,1 |
| 10 | 154,8 | 153,5 | 155,2 |
| 10,5 | 159,4 | 158,1 | 159,6 |
| 11 | 163,8 | 162,6 | 163,9 |
| 11,5 | 168,2 | 167,4 | 169,6 |
| 12 | 172,4 | 171,1 | 173,2 |
| 12,5 | 176,4 | 175 | 177,8 |
| 13 | 180,7 | 178,7 | 182,5 |

Fuente: El autor

Anexo B. Perfil de temperaturas de los ciclos de tostión de café color medio

| Tiempo min | Temperatura °C Ciclo 10 | Temperatura °C Ciclo 11 | Temperatura °C Ciclo 12 |
|-----------------------|--|--|--|
| 0 | 180 | 180 | 180 |
| 0,5 | 155,7 | 154,2 | 156,3 |
| 1 | 138,5 | 136,1 | 135,1 |
| 1,5 | 125,4 | 122,7 | 121,8 |
| 2 | 119,3 | 117,6 | 118,4 |
| 2,5 | 117,9 | 114,2 | 118,1 |
| 3 | 118,5 | 116,3 | 118,9 |
| 3,5 | 121,4 | 119,8 | 121,5 |
| 4 | 123 | 122,2 | 123,4 |
| 4,5 | 128,5 | 127,9 | 128,9 |
| 5 | 131,3 | 130,2 | 132 |
| 5,5 | 136,2 | 135,7 | 136,8 |
| 6 | 140,8 | 140,1 | 141,2 |
| 6,5 | 145,4 | 145,2 | 146 |
| 7 | 148,9 | 148,5 | 149,4 |
| 7,5 | 152,3 | 151,8 | 153,1 |
| 8 | 156 | 155,8 | 157,2 |
| 8,5 | 159,7 | 159,1 | 160,2 |
| 9 | 164,6 | 163,7 | 165,4 |
| 9,5 | 167,4 | 166,6 | 167,9 |
| 10 | 173,6 | 173 | 173,9 |
| 10,5 | 177,3 | 177,8 | 178,2 |
| 11 | 181,1 | 180,8 | 181,5 |
| 11,5 | 186,5 | 186,1 | 187 |
| 12 | 190 | 189,5 | 190,3 |
| 12,5 | 196,7 | 195,8 | 196,4 |
| 13 | 201,8 | 199,7 | 200,8 |

Fuente: El autor

Anexo C. Perfil de temperaturas de los ciclos de tostión de café color oscuro

| Tiempo min | Temperatura °C Ciclo 16 | Temperatura °C Ciclo 17 | Temperatura °C Ciclo 18 |
|-----------------------|--|--|--|
| 0 | 200 | 200 | 200 |
| 0,5 | 172,4 | 170,1 | 171 |
| 1 | 144,1 | 140,2 | 142,5 |
| 1,5 | 136,4 | 132,7 | 132,9 |
| 2 | 128,5 | 125,6 | 126,1 |
| 2,5 | 121,3 | 119,3 | 118,1 |
| 3 | 120,1 | 119,5 | 118,3 |
| 3,5 | 124,2 | 122,9 | 122,7 |
| 4 | 129,7 | 127,8 | 128,1 |
| 4,5 | 135,2 | 133,6 | 133,4 |
| 5 | 140,9 | 139,1 | 139 |
| 5,5 | 146,6 | 145,3 | 144,9 |
| 6 | 151,7 | 149,7 | 150,6 |
| 6,5 | 156,7 | 155,4 | 157,1 |
| 7 | 161,9 | 159,6 | 162,3 |
| 7,5 | 166,2 | 164,5 | 167,1 |
| 8 | 172,3 | 170,7 | 172,7 |
| 8,5 | 177,7 | 175,3 | 177,3 |
| 9 | 183,3 | 180,9 | 182,4 |
| 9,5 | 189 | 187,1 | 188,4 |
| 10 | 194,7 | 192,2 | 193,9 |
| 10,5 | 200,6 | 197,6 | 199,8 |
| 11 | 206,7 | 203,4 | 205,6 |
| 11,5 | 211,6 | 208,8 | 210,3 |
| 12 | 214,8 | 213,9 | 215,7 |
| 12,5 | 216,7 | 217,6 | 218,2 |
| 13 | 221,1 | 219,6 | 220,2 |

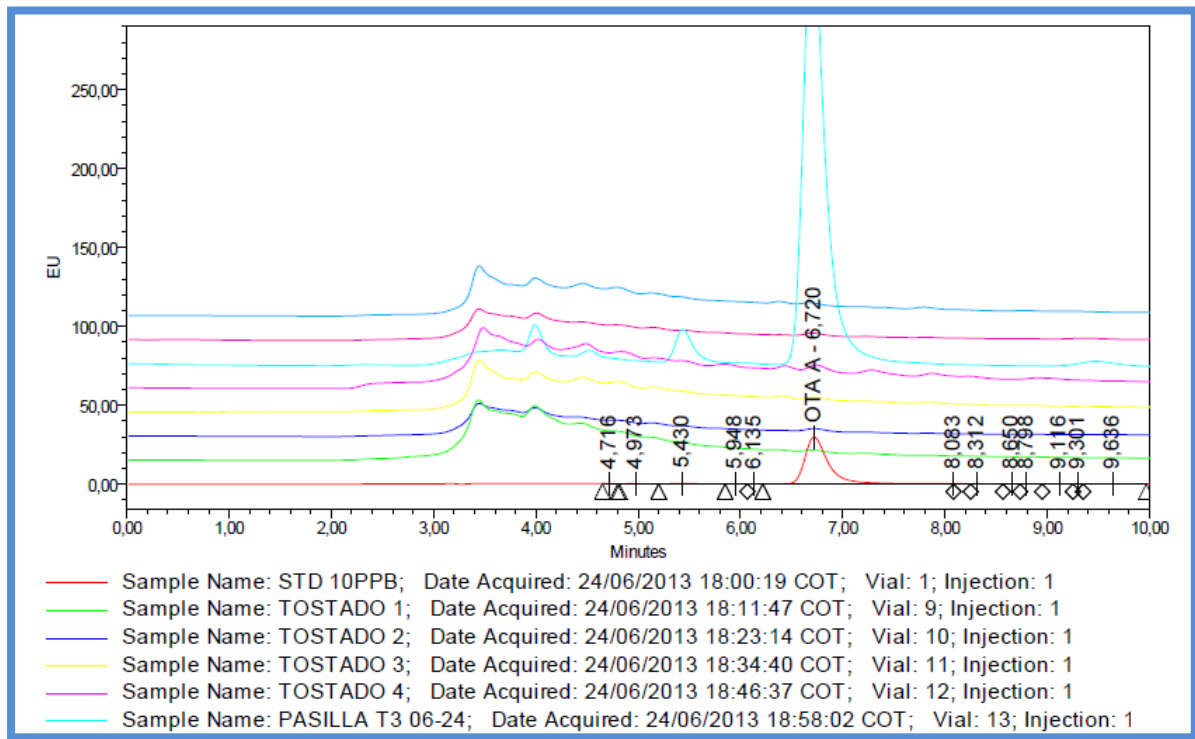
Fuente: El autor

Anexo D. Perfil de temperaturas de los ciclos de tostión de café color muy oscuro

| Tiempo min | Temperatura °C Ciclo 22 | Temperatura °C Ciclo 23 | Temperatura °C Ciclo 24 |
|-----------------------|--|--|--|
| 0 | 215 | 215 | 215 |
| 0,5 | 159,0 | 157,1 | 157,6 |
| 1 | 135,0 | 131,5 | 131,5 |
| 1,5 | 119,0 | 118,8 | 118,5 |
| 2 | 120,6 | 119,6 | 119,1 |
| 2,5 | 123,1 | 123,4 | 123,7 |
| 3 | 128,5 | 127,6 | 127 |
| 3,5 | 134,0 | 132,7 | 133 |
| 4 | 139,3 | 138,1 | 139 |
| 4,5 | 144,2 | 142 | 142 |
| 5 | 149,8 | 146,6 | 148 |
| 5,5 | 154,4 | 151,6 | 153 |
| 6 | 159,1 | 156,5 | 157 |
| 6,5 | 164,0 | 161,4 | 163 |
| 7 | 168,5 | 165,8 | 166 |
| 7,5 | 173,2 | 170,6 | 172 |
| 8 | 178,0 | 176,1 | 176 |
| 8,5 | 183,2 | 184,7 | 184,2 |
| 9 | 191,1 | 190,4 | 189 |
| 9,5 | 196,2 | 196,8 | 195,3 |
| 10 | 201,1 | 200,6 | 199,8 |
| 10,5 | 208,8 | 207,1 | 208,1 |
| 11 | 216,4 | 215,9 | 215,2 |
| 11,5 | 224,5 | 223,3 | 224,1 |
| 12 | 230,0 | 230,8 | 230,1 |
| 12,5 | 236,7 | 236,1 | 235,9 |
| 13 | 241,8 | 240,2 | 239,8 |

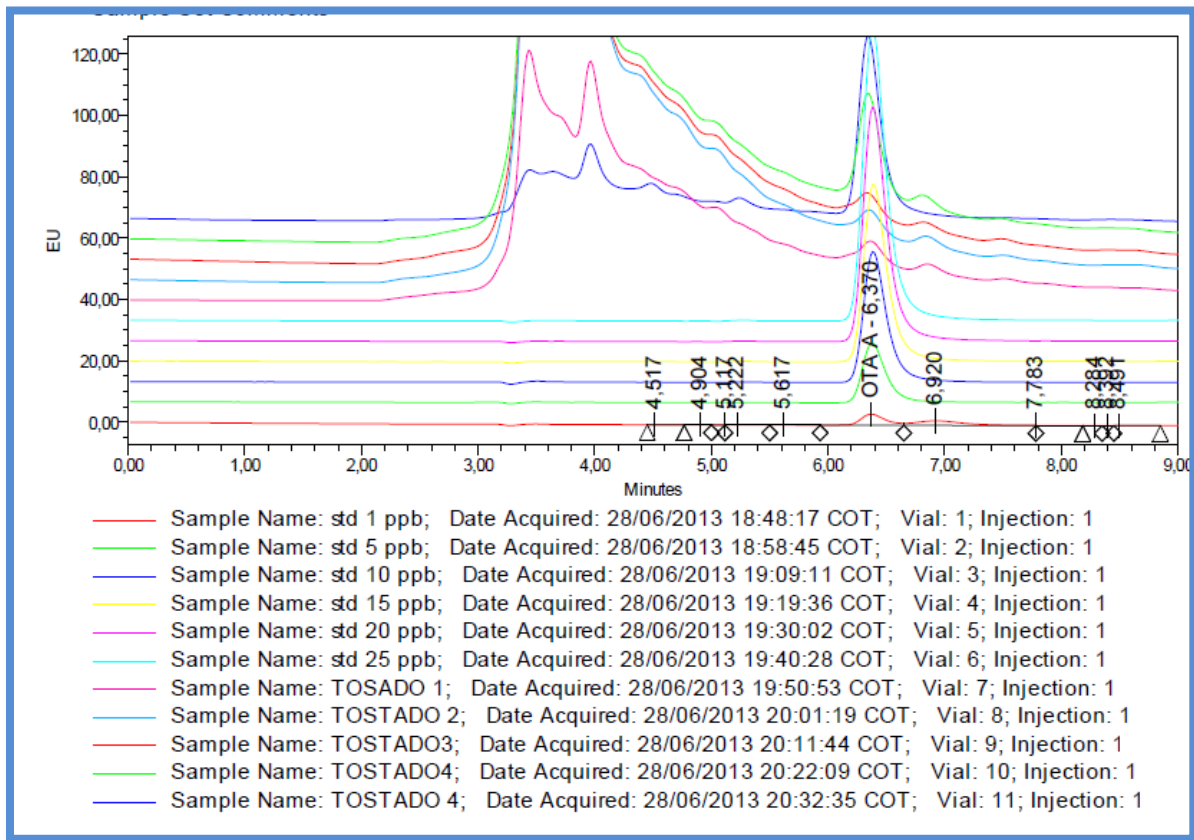
Fuente: El autor

Anexo E. Cromatograma de materia prima y tostiones



Fuente: El autor

Anexo F. Cromatograma de curva de calibración y tostiones



Fuente: El autor