

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Identificación de hongos potencialmente micotoxigénicos, asociados al café tostado.

Por:

ALEJANDRA AYALA MONTOYA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México

Mayo de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Identificación de hongos potencialmente micotoxigénicos, asociados al café
tostado.

Por:

ALEJANDRA AYALA MONTOYA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por el Comité de Asesoría


Asesor Principal

Dra. Yisa Maria Ochoa Fuentes


Coasesor

Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz


Coasesor

M.C. Mariana Beltrán Beache


Coordinador de la División de Ciencia Animal

Dr. José Dueñez Alarís



Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Identificación de hongos potencialmente micotoxigénicos, asociados al café
tostado.

Por:

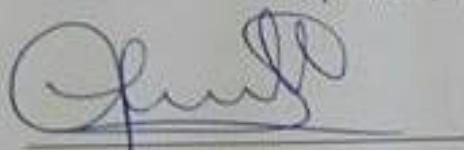
ALEJANDRA AYALA MONTOYA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

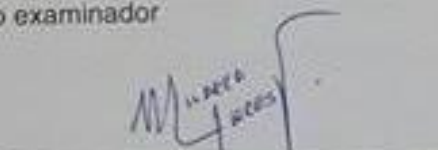
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por el Jurado examinador



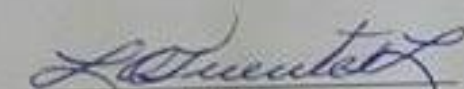
Presidente

M.C. Xochitl Ruelas Chacón



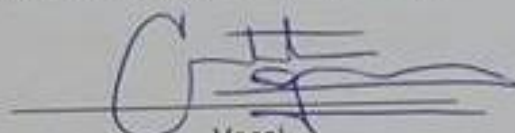
Vocal

M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui



Vocal

M.C. Laura Oliva Fuentes Lara



Vocal

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

~~Coordinador de la División de Ciencia Animal~~

~~Dr. José Dueñez Alanís~~



Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios, creador de todo. Gracias Señor por permitirme llegar a este punto de mi vida, por darme las fuerzas para cumplir mis metas, por cada una de las personas maravillosas que han estado conmigo durante este tiempo.

A mi Alma Mater, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; por formarme profesionalmente, recibirme, cobijarme dentro de la residencia femenil y brindarme experiencias inolvidables durante este periodo maravilloso, a todos los profesores que contribuyeron a mi educación, al Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos por darme los conocimientos necesarios para mi formación profesional. Gracias por permitirme ser un orgulloso “Buitre” de la Narro....

A la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes por darme la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo, por confiar y creer en mí, mil gracias.

Al Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz, por su colaboración, disposición y toda la ayuda que me proporcionó, por los conocimientos brindados, por su paciencia y comprensión durante este trabajo, gracias.

A la MC. Mariana Beltrán Beache, por su tiempo, colaboración y disposición durante la realización de este trabajo, gracias.

A la persona que me dio la vida y me enseñó el valor de la misma, quien me dio la oportunidad de cumplir mis sueños; por nunca dejarme sola a pesar de la distancia, por apoyarme en cada decisión que he tomado, por orientarme y darme la seguridad de que puedo hacer cualquier cosa que me proponga, por enseñarme la importancia de la educación, por ser mi motor y mi ejemplo de mi vida, porque si he llegado a ser lo que soy en este momento es por ti, y me llena de orgullo el poderte decir MAMÁ, por todo esto y mucho más... ¡MIL GRACIAS!

A mi hermana, la mejor que pudiera existir, a quien amo y admiro tanto...Gaby. Gracias por apoyarme siempre, por ser mi cómplice de vida, quien junto a mamá me enseñó que la distancia al final del día es solo un número, gracias por siempre escucharme, por los regaños y los consejos; a mi cuñado Alex, por escucharme, brindarme su apoyo.

A mi abuelita Cristina, por apoyarme y darme los ánimos para culminar esta etapa de mi vida, por ser el pilar todos y mantenernos unidos, por todos los momentos maravillosos que me ha dado desde mi infancia, y por mucho más, gracias abue. A mi familia en general, tíos, tías, primos, por cada palabra de aliento que me brindaron, cada abrazo al llegar a casa, por hacerme sentir capaz de soportar la distancia de todos ustedes día a día y nunca sentirme sola.

A todos mis amigos dentro y fuera de mi Alma Mater; a mis amigas internas, con quien formé una hermandad, gracias por la pequeña familia que formamos, por cada momento y experiencia que tuve a su lado, jamás los olvidaré.

DEDICATORIA

A ti, madre querida...

Esperando poner un poco de orgullo en tu mirada,
te entrego esta pequeña muestra de gratitud a todo
lo que has dado por mí, cada uno de mis triunfos,
son y serán para ti, te amo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
ÍNDICE DE CONTENIDO	7
ÍNDICE DE CUADROS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
RESÚMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	16
Objetivos Específicos	16
HIPÓTESIS	16
REVISIÓN DE LITERATURA	17
El Café	17
Origen	17
Taxonomía del café	17
Descripción botánica	18
Producción mundial de café	20
Consumo mundial	22
Producción nacional de café	23
Importancia a nivel nacional del cultivo de café	25
Enfermedades en el cafeto	26
La roya de café (<i>Hemileia vastatrix</i>)	26

Ojo de gallo (<i>Mycena citricolor</i>).....	28
Mancha del fruto (<i>Cercóspora coffeicola</i> Berk Cooke).....	29
Enfermedades en el café en grano	29
<i>Penicillium</i> spp.	32
<i>Fusarium</i> spp.	32
<i>Aspergillus</i> spp.....	33
Micotoxinas.....	34
Micotoxinas producidas por <i>Penicillium</i> sp.	36
Ocratoxina A	36
Patulina	37
Citrinina.....	37
Legislación.....	38
Inocuidad y calidad alimentaria	38
APPCC	39
Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y Normas Mexicanas (MXN).....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Muestreo.....	43
Aislamiento	44
Identificación de género.....	44
Identificación molecular	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
Resultados.....	46
Discusiones	51
CONCLUSIONES	56

LITERATURA CITADA.....	57
APÉNDICE.....	66
Apéndice 1.....	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Clasificación taxonómica del cultivo de café (Carlier Smith y Marzocca. A, 1981).....	18
Cuadro 2.- Principales países productores de café verde, 2003-2013 (Toneladas) (FAOSTAT, 2015).....	21
Cuadro 3.- Microorganismos aislados del beneficio del café (Temis-Pérez <i>et al.</i> , 2011).....	30
Cuadro 4.- Principales tipos de micotoxinas, hongo productor y alimento afectado (Arroyo <i>et al.</i> , 2014).....	35
Cuadro 5.- Normas relativas al café (NOM-NMX) (ICO, 2013)	40
Cuadro 6.- Tiendas de autoservicio visitadas y número de muestras obtenidas	43
Cuadro 7.- Condiciones utilizadas en la PCR	46
Cuadro 8.- Identificación morfológica a género.....	47
Cuadro 9.- Muestras a las cuales se realizó la extracción de ADN.....	49
Cuadro 10.- Clasificación molecular de acuerdo a la comparación de secuencias con NCBI.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Flor del cafeto (Gómez, 2010)	19
Figura 2.- Estructura del fruto de café (Alvarado, et. al 1994).....	19
Figura 3.- Ramo fructífero de café (Gómez, 2010)	20
Figura 4.- Producción mundial (OIC, 2011).....	20
Figura 5.- Consumo mundial de café, 2002/3-2015/16 (FIRA, 2015).....	22
Figura 6.- Estados productores de café en México (CEFP, 2001)	24
Figura 7.- Principales estados productores de café cereza, 2012/13 - 2014/15 (FIRA, 2015)	25
Figura 8.- Fotografía de <i>Penicillium</i> al microscopio	48
Figura 9 Fotografía de <i>Alternaria</i> al microscopio	49
Figura 10.- Visualización de ADN. 1 y 2 muestra 061805-1; 3 y 4 muestra 061813-2; 5 y 6 muestra 061805-2; 7 y 8 muestra 061805-3; 9 y 10 muestra 061813-3.....	50
Figura 11.- Visualización de la amplificación por PCR. 1 muestra 061805-1; 2 muestra 061813-2; 3 muestra 061805-2; 4 muestra 061805-3; 5 muestra 061813-3.....	50

RESÚMEN

La producción de café se realiza principalmente en América Latina, Asia y África, Brasil se ubica en primer lugar de producción a nivel mundial desde 1840 aportando el 30 por ciento de la producción, mientras que México empata el quinto lugar con India representando 3.5 por ciento. El café es uno de los principales cultivos agrícolas debido a la generación de ingresos para los países exportadores, llegando a generar más de 15 mil millones de dólares, además de dar ocupación a más de 20 mil millones de personas dentro del ámbito cafetalero. En México este cultivo se ubica en el sexto lugar en cuanto a área sembrada, y genera divisas por ventas de hasta 800 millones de dólares, además se considera como una producción prácticamente artesanal. En cuanto al consumo de café en nuestro país, este ha ido incrementando en los últimos años, llegando a un consumo per cápita de 1.1 kg.

El café en grano es susceptible a distintos agentes patógenos, aun habiendo sido sometido a tratamientos térmicos. Para el análisis realizado en este trabajo se llevó a cabo un muestreo en centros comerciales de la ciudad de Saltillo recolectando un total de diecisiete muestras de café, se realizó un aislamiento y a partir de los granos de café sembrados se hizo la identificación morfológica del hongo desarrollado, se identificaron tres géneros en las muestras analizadas: *Penicillium*, *Alternaria* y *Rhizopus*. Para la identificación a nivel de especie se seleccionó el género *Penicillium* realizando una amplificación de ADN por medio de la PCR, las secuencias obtenidas y comparadas con la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) mediante el programa BLAST demostró la presencia de dos especies: *Penicillium digitatum* y *P. expansum*. Cabe destacar que los hongos identificados a partir de los granos de café analizados, bajo las condiciones necesarias pueden ser productores de metabolitos tóxicos, denominados micotoxinas, las cuales pueden ser dañinas para el consumidor, una de ellas es

la ocratoxina A, generada por el género *Penicillium*, los daños provocados por su ingesta se ven reflejados en fallas renales y posiblemente sea cancerígena; otra micotoxina que pudiese presentarse de acuerdo a los hongos identificados en este trabajo es la patulina, micotoxina producida por *P. expansum* la cual, es resistente a tratamientos térmicos, causante de lesiones en vísceras y puede llegar a provocar daños en el sistema inmunológico, nervioso y gastrointestinal.

Palabras claves: café tostado, hongos, PCR, identificación, *Penicillium*.

INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos hace referencia a todos los riesgos que puedan hacer que dichos alimentos sean nocivos para la salud del consumidor, algunos de los riesgos pueden ser estado de descomposición, contaminación con suciedad, decoloración y olores desagradables (FAO-OMS, 2003).

En la actualidad, la inocuidad y seguridad alimentaria ha permanecido como una necesidad humana básica. En los últimos años, el aseguramiento de la inocuidad de los alimentos se ha constituido como una meta de acción internacional y nacional. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha caracterizado como peligro químico a la contaminación de los alimentos con micotoxinas, como fuentes importantes de las enfermedades transmitidas por los alimentos (OMS, 2002).

Los alimentos pueden contener organismos o sustancias peligrosas, que formen parte del mismo o hayan sido introducidas durante las operaciones de procesamiento, que se denominan agentes químicos de riesgo. Su presencia puede deberse a, entre otras causas, residuos procedentes de la adición intencionada de sustancias (como los plaguicidas, los medicamentos veterinarios y otros productos utilizados en la producción primaria) o sustancias tóxicas presentes naturalmente en los alimentos como las micotoxinas (Arroyo *et,al.*, 2014).

Las micotoxinas comprenden serios efectos sobre los seres humanos y los animales que han llevado a muchos países a fijar reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones como forma de proteger la salud humana y los intereses económicos de los productores y del comercio (FAO, 2004).

La calidad final de un producto depende de forma directa de algunos factores, como son los tratamientos a los que se someten después de su cosecha, sin dejar de lado las enfermedades que le pudieran afectar durante su cultivo como en el transcurso de su procesamiento, almacenamiento y comercialización (Temis-Pérez *et al.*, 2011).

Los granos almacenados pueden ser invadidos por hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phoma*, *Sporendonema* y algunas especies de *Fusarium* (Elegbede, 1978). Los factores que influyen en la formación de estos hongos son principalmente el contenido de humedad del grano almacenado, la temperatura, el periodo en el que es almacenado y materia ajena al grano (Ominski *et al.*, 1994).

JUSTIFICACIÓN

La presente investigación es debida a la poca información que se encuentra acerca de microorganismos patógenos presentes en el grano de café una vez ya procesado. En México y otros países se han reportado presencia de patógenos en la cereza de café y en granos; sin embargo, no hay reportes de dichos patógenos una vez ya sometido a procesamientos y expuesto al consumidor.

OBJETIVOS

Identificación de hongos asociados al grano de café tostado.

Objetivos Específicos

Identificación morfológica de hongos asociados con café tostado, potencialmente micotoxigénicos.

Identificación molecular de hongos asociados con café tostado.

HIPÓTESIS

Encontrar por lo menos un hongo potencialmente micotoxigenico en granos de café tostado comercializados en supermercados de la ciudad de Saltillo.

REVISIÓN DE LITERATURA

El Café

Origen

El café, se define como la semilla seca de la planta del café, sin importar que haya sido tostada o molida (Badui, 1993). La cuna del café es generalmente colocada en la alta Etiopia, haciendo uso de este grano desde tiempos inmemoriales. (Gómez, 2010). La historia del café comienza en una provincia de Kaffa, Etiopia y que el café fue llevado hacia Yemen y Arabia por los esclavos que eran llevados a esos sitios, para el siglo XV el café ya era cultivado en Yemen. (ICO, s.f; Alvarado,Rojas, 1994)

La llegada del cultivo de café a América se dio en el año de 1727, siendo trasladado de Sumatra a Brasil. En 1740 se extendió a Puerto Rico y El Salvador, llegó a Costa Rica entre 1796 y 1798 procedente de Cuba y Guatemala (Alvarado *et al.*, 1994). En el caso de México la introducción de café se dio hace 200 años (Cano-Flores *et al.*, 2004).

Taxonomía del café

El café está dentro del género *Coffea* y cuenta con aproximadamente 100 especies (Cuadro 1), sin embargo, sólo tres de estas especies se mencionan como cultivadas comercialmente, sobresaliendo las dos primeras de acuerdo al siguiente orden: *Coffea arabica* L., *C. canephora* Pierre exFroehner y *C. liberica* Bull exHiem (Alvarado *et al.*, 1994).

Cuadro 1.- Clasificación taxonómica del cultivo de café (Carlier Smith y Marzocca. A, 1981)

Taxonomía	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Sub-división	Angiospermae
Clase	Magnoliata
Sub-clase	Asteridea
Orden	Rubiales
Género	Rubiaceae
Especie (s)	<i>Arabica, canephora, etc.</i>

Descripción botánica

El cafeto es una arbustiva, el cual llega a medir entre 12 y 14 metros en tierras africanas y en algunas partes asiáticas, en la zona cafetera de América tan solo llega a medir de 4 a 6 metros (Gómez, 2010). La planta del cafeto está constituida por un tallo central, cuyo extremo consta de una parte meristemática en crecimiento contante, permitiendo que el tallo se alargue y el crecimiento de sus ramas laterales sea permanente, de esta manera se permite la forma cónica de la planta (ISIC, s.f).

Las flores del cafeto son hermafroditas (figura 1), el fruto (figura 2 y 3) es una drupa oblonga o esférica, más o menos carnosa, se encuentra encerrando dos núcleos delgados y pergaminosos, más o menos fuertes, convexo hacia afuera y planos hacia dentro, el surco que presenta el lado plano se ve reproducido en la semilla (Gómez, 2010).

El fruto consta de una superficie lisa y brillante, de pulpa delgada; y está constituido por tres partes deferentes: el epicarpio o epidermis, el mesocarpio o pulpa y el endosperma o semilla (figura 2). Cuando este madura la coloración puede variar de rojo a amarillo, dependiendo del cultivar (Alvarado *et al.*, 1994).

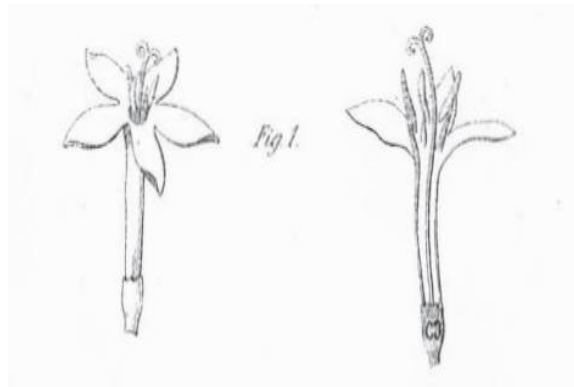


Figura 1.- Flor del cafeto (Gómez, 2010)

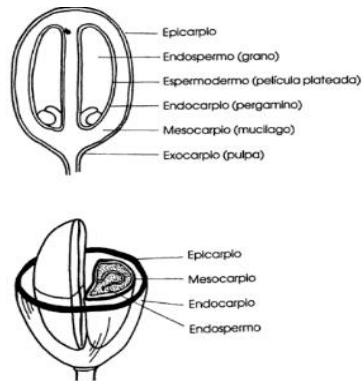


Figura 2.- Estructura del fruto de café (Alvarado, et. al 1994)



Figura 3.- Ramo fructífero de café (Gómez, 2010)

Producción mundial de café

La producción de café se da principalmente en países cuyo clima sea tropical, principalmente ubicados en América Latina, Asia y África (CEDRSSA, 2014), de acuerdo al Centro de Comercio Internacional (CCI, 2011) es en América Latina donde se produce la mayor cantidad de café del mundo, especialmente Brasil, quien desde el año 1840 se encuentra en la cabeza mundial de la producción (Figura 4).

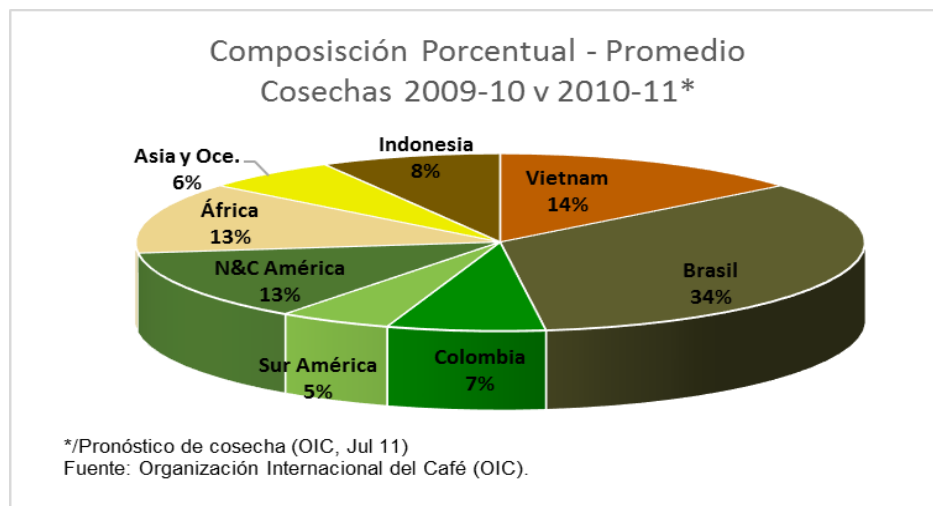


Figura 4.- Producción mundial (OIC, 2011)

Los principales productores de café a nivel mundial son Brasil, aportando el 30 por ciento de la producción total, le sigue Vietnam, Indonesia y Colombia representando el 13, 8 y 8 por ciento de la producción mundial respectivamente; India y México se ubican en el quinto lugar, representando el 3.5 por ciento de la oferta mundial del café (FAOSTAT, 2015) (Cuadro 2). El aporte de México a la producción mundial de café oscila entre los 4 a 5 millones de sacos por año (Cafés de México, 2006).

Cuadro 2.- Principales países productores de café verde, 2003-2013 (Toneladas) (FAOSTAT, 2015).

País / Año	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Brasil	1987074	2465710	2140169	2573368	2249011	2796927	2440056	2907265	2700540	3037534	2964538
Viet Nam	793700	913800	831000	985300	1251000	1055811	1057540	1105700	1276506	1565400	1461000
Indonesia	663571	647385	640365	682158	676475	698016	682591	684076	638600	691163	698900
Colombia	694080	674400	667140	724740	757080	688680	468720	535380	468540	462000	653160
India	275275	270500	275500	274000	288000	262000	262300	289600	302000	314000	318200
México	310861	312413	294364	279635	268565	260442	264472	245271	237056	246121	231596
Guatemala	244200	250279	248277	234712	243599	248471	249275	248359	265406	272668	253186
Perú	203148	231447	188611	273178	225992	273780	243479	264605	331547	314471	256241
Etiopía	126188	156170	171631	241482	273400	260239	265469	370569	376823	275530	270000
Honduras	175284	185090	190640	213636	236302	240948	231288	244335	284347	343403	273480

El café ha llegado a ser uno de los principales cultivos agrícolas, dado el valor que representa actualmente dentro del comercio internacional, generando más de 15 mil millones de dólares como ingresos anuales a los países exportadores de este grano, y da a más de 20 mil millones de personas ocupación dentro del ámbito cafetalero, desde el cultivo, transformación, procesamiento y comercialización de dicho producto a nivel mundial. (CEFP, 2001).

En la producción de café se distinguen dos variedades principales: arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora*), el primero tiene mayor preferencia en el mercado internacional ya que produce granos de mayor calidad y el sabor que presenta es más suave que el café robusta, representando alrededor del 55% de la producción mundial (CEDRSSA, 2014).

Consumo mundial

El consumo del café creció a una tasa promedio anual de 2.3 por ciento en el periodo comprendido de los ciclos 2004/04 y 2014/15, siendo superior al ritmo de crecimiento de la producción que se reporta con una tasa promedio al año de 1.9 por ciento. Ascendiendo a un nivel máximo histórico de 146.0 millones de sacos de 60kg, representando un incremento de 2.2 por ciento con respecto al consumo del ciclo previo (FIRA 2015).

El consumo de café generalmente se distingue en dos formas: tostado y molido, y soluble. En la figura 5, se muestra el café tostado y molido representando el 86 por ciento del consumo total y presenta un crecimiento en la tasa promedio anual de 1.9 por ciento durante la última década (FIRA, 2015).

(Millones de sacos de 60kg, equivalente en café verde)

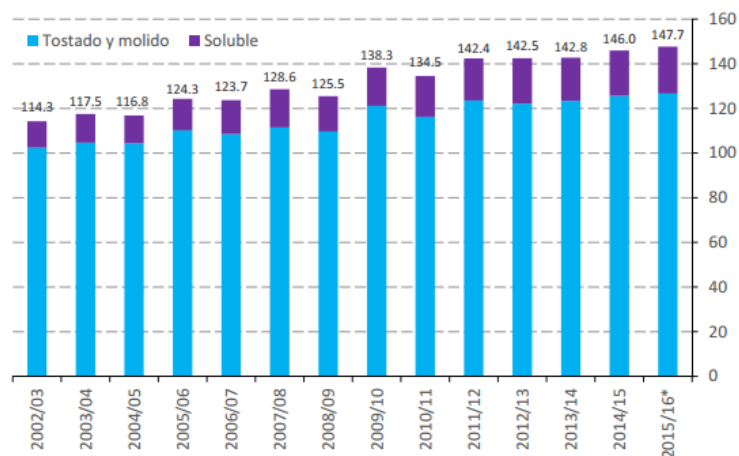


Figura 5.- Consumo mundial de café, 2002/3-2015/16 (FIRA, 2015)

Algunos de los países con un mayor consumo per cápita anual se encuentran Finlandia, con 12.1 kg; Noruega, con 9.0 kg; Austria, con 8.8 kg; Dinamarca, con 7.7 kg; y Suiza, con 8.3 kg (FIRA, 2015).

Producción nacional de café

La producción nacional de café se realiza en una superficie equivalente al 3.3 % de área total sembrada en México, durante el 2014 ocupó la sexta posición en este rubro, después del maíz grano, los pastos, el sorgo grano, el frijol y la caña de azúcar (FIRA, 2015)

De acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el año 2013 la superficie sembrada del cultivo de café en México fue de 760,974.05 hectáreas, de las cuales son cosechadas 688,208.41 ha, con un rendimiento de 1,287, 642 toneladas de café en cereza, con un valor superior a los 6,815 millones de pesos (SIAP, 2013).

Aproximadamente el 80 por ciento de la producción, se destina a los mercados de exportación, generando divisas por venta de café de hasta 800 millones de dólares, siendo sólo superadas por las ventas externas de petróleo (Bartra, 2006)

La producción de café, es de carácter minifundista, de acuerdo con la estratificación de predios cafetaleros en México, el 97.9 por ciento de los productores poseen predios menores a 5 hectáreas, de estos solo el 69.4 por ciento de los productores tienen menos de una hectárea, el 15.8 por ciento entre una y dos hectáreas, y el 10.0 por ciento entre tres y cinco hectáreas. Este tipo de productores minifundistas concentra el 79.0 por ciento de la superficie establecida con café en México (AMECAFE, 2011).

De acuerdo a la ASERCA (2013) es posible afirmar que la producción cafetalera de México es prácticamente artesanal y un porcentaje significativo de los productores son principalmente indígenas.

Los estados productores de café, están situados en la parte centro-sur del país, dichos estados son: Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Puebla, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Colima, Tabasco y Querétaro (Figura 6), (Bartra, 2006).

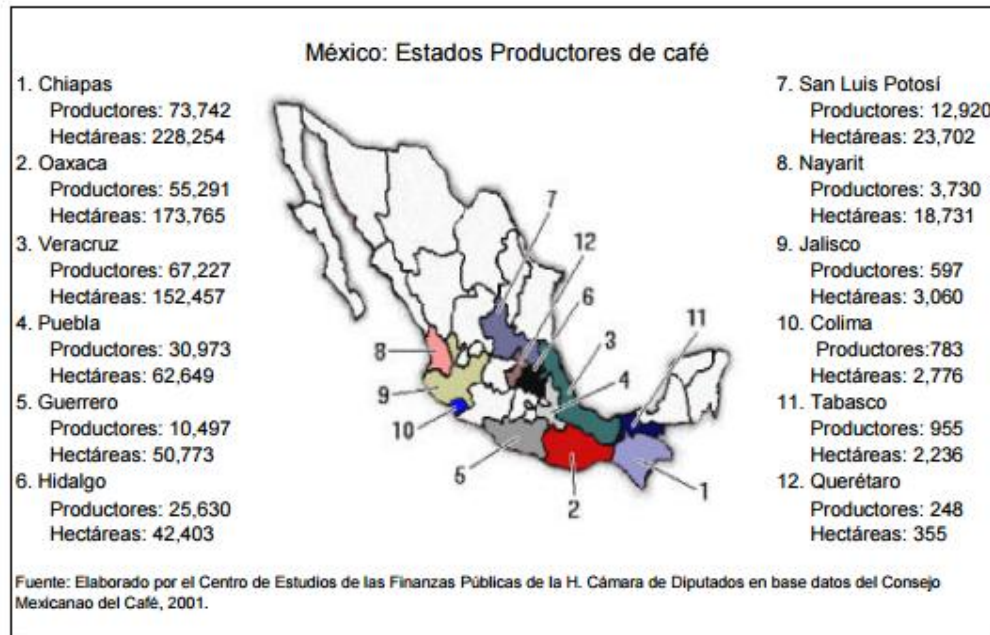


Figura 6.- Estados productores de café en México (CEFP, 2001)

La producción cafetalera se concentra básicamente en cuatro estados: Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca, representando el 94 por ciento de la producción total nacional, el 85 por ciento en cuanto superficie cosechada y el 83 por ciento de los productores dedicados a este cultivo en el país (Bartra, 2006).

El estado líder en producción de café es Chiapas (Figura 7), quien además presenta un rendimiento por hectarea superior al promedio mundial, siendo este de 2090 kg/ha durante el ciclo de 2012; mientras que el rendimiento promedio a nivel mundial es de 691kg/ha en el mismo ciclo. Durante el mismo ciclo agrícola, tuvo una producción de 532 mil toneladas de café cereza, generando el 40 por ciento del valor de producción cafetalera del país. Chiapas, Veracruz y Puebla representan de manera conjunta el 88 por ciento del valor de producción del café durante 2012 (Flores, 2015).

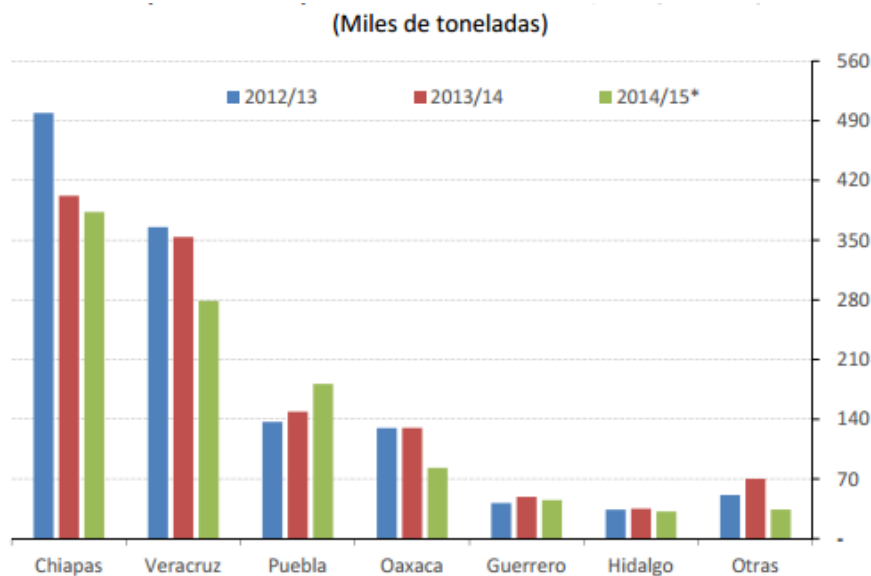


Figura 7.- Principales estados productores de café cereza, 2012/13 - 2014/15 (FIRA, 2015)

Importancia a nivel nacional del cultivo de café

Para México, el café representa una actividad estratégica, con base en el registro de Padrón Nacional Cafetalero (PNC), el cultivo del café se desarrolla en 12 estados, abarcando 404 municipios, 4mil 572 localidades, por 510 mil 544 productores y en 675 mil 258 hectáreas (AMECAFÉ-SIAP, s.f) e involucra exportaciones por 897 millones de dólares al año, además de ser el principal productor de café orgánico en el mundo, vincula directa e indirectamente a cerca de 3 millones de personas, generando un valor en el mercado de alrededor de 20 mil millones de pesos por año (SAGARPA, s.f).

El consumo de café en México es de los más bajos entre países productores, aunque se ha registrado un consumo mayor comparado con años anteriores, el consumo per cápita oscila en 1.1 kg. (Robles, 2011).

Chiapas además de ser el principal productor de café a nivel nacional, ocupa el primer lugar en producción de café orgánico a nivel mundial, generando 18 millones de toneladas anuales, producidas por más de 60 mil productores, una tercera parte de dichos productores son mujeres indígenas y campesinas que cultivan los cafetos bajo la sombra de árboles nativos, sin usar agriquímicos para evitar contaminar la tierra (Mariscal, 2011).

Enfermedades en el cafeto

Debido a los cambios climáticos de precipitación y temperatura, está previsto que la prevalencia de plagas y enfermedades aumenten, haciendo que el rango altitudinal se amplíe lo cual permitiría que diferentes plagas y enfermedades sobrevivan, como “la broca de café” (*Hypothenemus hampei*), que perfora el grano de café cereza aun cuando este se encuentra en el árbol; “la roya de café” (*Hemileia vastatrix*), que afecta principalmente las hojas del árbol, “ojo de gallo” (*Mycena citricolor*), que forma manchas en los tallos, hojas y frutos, “mancha de fruto” (*Cercospora coffeicola Berk Cooke*), (Läderach *et al.*, 2011), y algunos de los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Temis- Pérez *et al.*, 2011).

La roya de café (*Hemileia vastatrix*)

Esta enfermedad ingreso al país en 1981, y es producida por el hongo *Hemileia vastatrix*. Los ataques de este hongo se producen en épocas de lluvias ligeras y corto periodo de buen tiempo. La espora de este hongo es muy resistente y se puede transportar por corrientes de aire o adherida a cualquier objeto, teniendo una germinación, en condiciones ideales, de sólo tres horas (CEFP, 2001).

La infección por este hongo ocasiona la caída prematura de las hojas y, si además, hay ataques por insectos, deficiente fertilización y deficiente manejo agronómico, se tiene un impacto en la producción. (FIRA, 2015). Los síntomas y daños causados por esta enfermedad, inician con pequeñas manchas de 1-3 mm aproximadamente, notorias y de color amarillo claro; la lesión va creciendo de tamaño y puede interactuar con otras manchas, formando grandes parches con polvillo amarillo (esporas) en el reverso de las hojas; las lesiones más antiguas llegan a necrosarse, sin embargo, la esporulación puede continuar (Castro *et al.*, 2009).

Los daños severos de esta enfermedad, llegan a causar defoliación. Si la infección ocurre en etapas tempranas del cafeto se puede presentar una reducción del rendimiento; sin embargo, si la enfermedad se presenta en etapas tardías el efecto a observar será en los niveles de amarre de fruto del siguiente ciclo de cultivo (SINAVEF, 2013).

En el año 2012 la roya entro a México con un nivel más severo, afectando de manera contundente la producción en Chiapas, en los años siguientes el efecto negativo ocurrió en Veracruz, Oaxaca y Guerrero, aunado a lo anterior, se reportaron afectaciones negativas debido a altas temperaturas y menor cantidad y distribución de lluvias (FIRA, 2015).

El Centro de Estudios de las Finanzas Públicas (2001) menciona que la roya y la broca de café forman parte de los problemas centrales en el campo cafetalero mexicano, ya que, según estadísticas del Consejo Mexicano del Café, dichas enfermedades afectaron de 1992 a 1996 aproximadamente 397 mil 063 hectáreas, siendo Chiapas el estado con mayor afección al tener 239 mil 095 has. y Oaxaca con 80 mil 510 has.

Ojo de gallo (*Mycena citricolor*)

Mycena citricolor es el hongo responsable de esta enfermedad, de acuerdo a Ashby (1925) y Rao *et al.* (1985) la presencia de cristales de oxalato de calcio en el cultivo juega un papel importante para el desarrollo del hongo, ya que captura el calcio de las paredes celulares del hospedero provocando debilidad en el tejido, dejando acceso a la hifa.

El desarrollo de esta enfermedad está relacionada con la humedad relativa y lluvias; al iniciar los ciclos de lluvias en la región del cultivo hay un incremento elevado y rápido en el número de lesiones por hojas y en la cantidad de hojas enfermas; al poco tiempo, inicia la aparición de gemas o también llamadas cabecitas, las cuales, una vez ya maduras, se desprenden y son arrastradas por la misma lluvia hacia hojas cercanas propagándose más la enfermedad (Bonilla, 1979; Vargas *et al.*, 1986; Avelino *et al.*, 1995)

El síntoma característico de esta enfermedad, es la formación de pequeñas manchas en las hojas, generalmente circulares, las lesiones jóvenes son de tonalidad oscura, mientras que las más antiguas son de color más claro y al llegar la época de sequía el tejido cae (Buller, 1934; Wellman, 1950). Las ramas jóvenes y frutos también pueden ser atacadas produciendo pequeñas decoloraciones, y si el ataque es severo, podría provocar la caída de la cereza (Buller, 1934).

El efecto que causa *M. citricolor* en los rendimientos se debe a la defoliación, y esta, depende de la ubicación de la lesión en la hoja, no del número de lesiones encontradas (Wellman, 1950).

Mancha del fruto (*Cercóspora coffeicola* Berk Cooke)

Esta enfermedad, también es conocida como la mancha de hierro, ataca las hojas y los frutos del cafeto, especialmente a los cultivos cuya ubicación esté expuesta al sol y escaso de nutrimentos (Castaño, 1956; Fernández *et al.* 1982).

La sintomatología que se presenta ante este patógeno es la aparición de manchas circulares en hojas y frutos del cafeto, estas manchas presentan generalmente tres colores concéntricos: en el centro, una mancha grisácea con puntos negros rodeada por una especie de anillo con tonalidad café-rojiza y, finalmente, un halo amarillo (ANACAFE, s.f; Castaño, 1956).

Las condiciones favorables para el desarrollo de este hongo son las temperaturas elevadas, esto ocasiona que en temporada de verano y meses de clima cálido sea más destructivo (Castaño, 1956). Aunado a lo anterior, el debilitamiento posterior a la cosecha en el cafetal, la disminución de la humedad relativa del suelo y una deficiente nutrición en cuanto a minerales, predisponen que el hongo tenga una situación óptima para su ataque; la severidad de esta enfermedad radica en la defoliación y pérdida del fruto (ANACAFE, s.f).

Enfermedades en el café en grano

La biodiversidad microbiana que se puede presentar en los frutos y los granos de café depende de la variedad de café, el método de procesamiento, el medio ambiente en el cual fue cultivado, y el suelo (Baista *et al.*, 2009).

La carga microbiana puede degradar compuestos presentes en los granos de café, incluso llegan a influir en la calidad del producto final. Por ello es importante para el procesamiento del café tener conocimiento de las especies microbianas dominantes presentes (Marques-Vilela *et al.*, 2010).

Se han reportado presencias de hongos filamentosos, bacterias y levaduras en la cereza y en los granos producidos en Brasil, India, Hawái, Congo, Argentina, Colombia, Costa Rica, Etiopia y México (Avallone *et al.*, 2001, Silvia *et al.*, 2004).

Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos que se reproducen de manera natural por esporas, sexual o asexualmente (Vargas y Villamizar, 2005).

Actualmente se conocen unos 200 hongos productores de toxinas, que ejercen su poder con cantidades extremadamente bajas, inclusive en partes por billón (Pascual, 2005). Los mismos, además de actuar como patógenos oportunistas, son capaces de causar enfermedades y síndromes clínicos en el ser humano y los animales. Estas enfermedades son conocidas en forma global como micotoxicosis (Murray *et al.*, 2006).

Alvindhia y Acda (2010), mencionan que la microbiota del grano de café es diversa y está compuesta por 26 especies de 14 géneros (Cuadro 3), entre los que se encuentran: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cylindrocarpon*, *Crysosporim*, *Fusarium*, *Leptosphaerulina*, *Microascus*, *Microdiplodia*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* y *Rhizospus*.

Cuadro 3.- Microorganismos aislados del beneficio del café (Temis-Pérez *et al.*, 2011)

Bacterias	Levaduras	Mohos filamentosos
<i>Acicetobacter spp</i>	<i>Arula sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Candida ernobii</i>	<i>Aspergillus chevalieri</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Candida fukuyamaensis</i>	<i>Aspergillus foetidius</i>
<i>Bacillus macerans</i>	<i>Candida membranifaciens</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Candida carpophila</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Aspergillus tubigenensis</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Floekera sp.</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
<i>Erwinia herbicola</i>	<i>Kluyveromyces sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia anómala</i>	<i>Cladosporium cladosporoides</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pichia caribbica</i>	<i>Cladosporium macrocarpum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Rodotorula mucilaginosa</i>	<i>Cylindrocarpon sp.</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Eurotium chevalieri</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Fusariella sp.</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Fusarium sp.</i>
<i>Serratia sp.</i>		<i>Fusarium clamidosporum</i>
		<i>Fusarium lateritium</i>
		<i>Fusarium nivale</i>
		<i>Fusarium solani</i>
		<i>Fusarium sporotrichioides</i>
		<i>Geotrichum sp.</i>
		<i>Mucor hiemalis</i>
		<i>Penicillium brevicompactum</i>
		<i>Penicillium commune</i>
		<i>Penicillium decumbens</i>
		<i>Penicillium fellutanum</i>
		<i>Penicillium implicatum</i>
		<i>Penicillium roqueforti</i>
		<i>Phoma sp.</i>
		<i>Ulocladium sp.</i>

En el almacenamiento del café, si se manejan las condiciones adecuadas de humedad y una temperatura ambiente, el comportamiento de este es estable, por tanto, el deterioro es lento. Esto no quiere decir que esté exento de presentar desarrollo de micotoxinas, en café que ha sido almacenado durante tiempos más largos de lo habitual y con una humedad del grano mayor al 14% (Anzueto, s.f).

Durante el almacenamiento de los granos algunos de los mohos presentes en el café producen micotoxinas. La mayoría son de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Penicillium*. Las micotoxinas que pudieran producir son las aflatoxinas y la ocratoxina A (OTA), siendo esta última la de mayor importancia por los efectos negativos que provoca (Soliman, 2002; Perrone *et al.*, 2007).

Penicillium spp.

Es un hongo de crecimiento rápido, dando colonias blancas aterciopeladas inicialmente, las cuales se cubren con los esporos y van tomando diferentes colores según la especie; al final quedan completamente cubiertas de esporos con un aspecto pulverulento. La colonia está constituida por micelio de hifas delgadas septadas. El verticillum es fundamental en la clasificación del hongo, así pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: monoverticillata, asimétrica, biverticillatasimétrica y poliverticillata (Guzman, 1977).

Fusarium spp.

Crece dando una colonia blanca la cual produce un pigmento color vino que gradualmente difunde en el medio. El micelio está formado por hifas septadas y los conidióforos presentan racimos de macroconidios. Se observan también clamidosporas y microconidios (Guzmán, 1977). Algunas especies de interés agrícola son *Fusarium oxysporum*, causante de la marchitez en algodón, el mal

de Panamá en el banano y de la podredumbre basal en frijol; y *Fusarium solani*, responsable de la pudrición radicular de la yuca y de los tubérculos de la papa (Finch y Finch, 1997). El ataque de este hongo en cultivos de café se da en el semillero y sus síntomas consisten en reducciones del diámetro del tallo a nivel de suelo, lesiones color café oscuras en la base del tallo, las plantitas pueden llegar a marchitarse (ANACAFE, s.f).

***Aspergillus* spp.**

Pertenece a la división Deuteromycota, clase Hyphomycetes, orden de los Hyphomycetales y familia Moniliaceae (Ortega, 2002). Los *Aspergillus* sp se caracterizan por tener micelio vegetativo compuesto de hifas septadas, ramificadas, incoloras, estructura conidial desarrollada como pelos y cabezuelas de origen en células hifales especializadas (células del pie), de paredes gruesas, las cuales producen conidióforos como ramas aproximadamente perpendiculares al eje de la célula del pie (García y Verástegui, 2001).

Algunas especies de *Aspergillus*, son mitospóricas, entre ellas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nonius*, considerados como los principales productores de aflatoxinas (Kurtzman *et al.*, 1987). Se citan también como productores de aflatoxinas *Aspergillus pseudotamarii* (Ito *et al.*, 2001) y a *Aspergillus bombycis* (Peterson *et al.*, 2001) pero esto no ha podido ser confirmado siempre a nivel laboratorial (Cabañes *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001).

Micotoxinas

Derivan de las palabras griegas *Mikes*, hongo y *toxina*, veneno. Su formación tiene lugar al final de la fase de crecimiento, durante la fase estacionaria siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación (Goldblatt, 1972).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos producidos por ciertos hongos que se desarrollan en productos agrícolas y cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reducen la actividad, hacen enfermar o incluso causan la muerte de animales y personas (Del Castillo, 2007). La producción es inevitable y depende de diferentes factores ambientales en el campo y/o durante el almacenamiento. Dado su carácter inevitable e impermisible, la contaminación por micotoxinas plantea un problema especial para la inocuidad de los alimentos (López & Park, 1999).

Son moléculas pequeñas, de peso molecular menor a 700kDa. La mayor parte de ellas se origina en la ruta policetónica, aunque existen otras rutas biocinéticas más complejas y las mismas relacionadas con un menor número de especies fúngicas productoras de la toxina (Moss, 1991). La presencia de estas micotoxinas puede darse en forma individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos en el organismo aumentando su toxicidad (Soriano, 2007).

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que las micotoxinas afectan a una cuarta parte de los cultivos a nivel mundial, incluyendo alimentos básicos, piensos o cultivos de gran valor como el café. Según datos publicados por el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF, s.f).

Actualmente se conocen más de 300 micotoxinas, de diferentes estructuras químicas y modos de acción en los seres vivos. Desde el punto de vista alimentario las toxinas producidas por mohos de los géneros *Aspergillus*,

Fusarium y *Penicillium* son las más importantes, siendo algunas de ellas las aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas y tricotecenos, afectando distintos tipos de alimentos, en donde su aparición es frecuente (Cuadro 4) (Arroyo *et al.*, 2014).

Cuadro 4.- Principales tipos de micotoxinas, hongo productor y alimento afectado (Arroyo *et al.*, 2014).

Tipo de Hongo	Micotoxinas producidas	Alimentos afectados
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1, B2, G1, G2	Maíz, sorgo, arroz, trigo, semillas oleaginosas, especias y frutos secos
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B1 y B2	Idem
Metabolito de aflatoxina B1 en mamíferos	Aflatoxina M1	Leche y productos lácteos
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxinas T-2 y HT-2	Cereales y derivados
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol (nivalenol) Zearalenona	Cereales y derivados
<i>Fusarium moniliforme</i> (<i>F. verticillioides</i>)	Fumonisinias B1 y B2	Maíz y derivados, sorgo, espárrago
<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A	Cereales, café, vino, frutas
<i>Penicillium expansum</i>	Patulina	Manzanas, zumos y derivados
<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Monascus</i>	Citrinina	Cereales, arroz rojo, frutas y quesos
<i>Aspergillus versicolor</i>	Esterigmatocistina	Cereales, café, jamón, pimienta y queso
<i>Hypocreales</i> (<i>Claviceps purpúrea</i>), <i>Eurotiales</i>	Alcaloides ergóticos (o del cornezuelo de centeno)	Cereales

Micotoxinas producidas por *Penicillium* sp.

Ocratoxina A

La Ocratoxina A es producida por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* los cuales se producen naturalmente en cereales, uvas, café y el cacao. La presencia de esta micotoxina en el café se descubrió en 1988, el moho encargado de su producción se puede encontrar en el café crudo y no es eliminado en su totalidad mediante el tostado (FAO, 2006).

La absorción de esta micotoxina se lleva a cabo por el tacto gastrointestinal, pasando a la circulación sistémica, siendo detectada en la sangre y en los tejidos, a una concentración elevada es detectada en los órganos que presentan mayor actividad metabólica, tal es el caso del riñón y hígado (Martínez, Andadón, 2006). Los mecanismos de acción mediante los cuales la ocratoxina A ejerce su toxicidad son la alteración sobre la respiración celular alteración de la síntesis de proteínas y el secuestro de calcio microsomal (López, 2000; Cheeke, 1998; Gekle *et al.*, 2000; López, Jimenéz, 2000), También presenta una semivida de eliminación considerablemente larga, en el hombre, su eliminación tarda 840 horas, es decir 35 días (Studer-Rohr *et al.*, 2000; López *et al.*, 2000).

El grado peligrosidad de esta micotoxina es tal que la OMS y la FAO han establecido un límite máximo tolerable para el ser humano de 100 milmillonésimos de gramo por kilogramo de peso corporal a la semana. La Unión Europea en el año 2004, estableció un límite máximo permisible en café tostado de 5ppb (FAO, 2006).

Patulina

Esta micotoxina es generada por diferentes hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Byssochalammys*. La patulina puede presentarse en frutas, cereales y hortalizas, así como en forrajes. Se puede encontrar por infección natural por *Penicillium* en frutas y legumbres sin elaborar o elaboradas (jugos, zumos, salsas, jaleas), la contaminación más frecuente es por medio de *Penicillium expansum*. La exposición humana no es previsible sino a partir de las frutas elaboradas. Dicha micotoxina no se destruye con la aplicación de calor, pero su concentración disminuye con un almacenamiento prolongado (FAO/OMS, 1999).

Los distintos efectos al organismo por la patulina son la debilitación del sistema inmunitario, ataca al sistema nervioso y tiene un efecto negativo para el sistema gastrointestinal, en ciertos animales es cancerígeno (Roussel, *et al.*, 2007). El límite permisible de consumo diario es de 0,4 mg/kg de peso corporal (FAO/OMS, 1999).

Citrinina

La citrinina es una micotoxina producida mayormente por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monascus*. Se localiza en las paredes de la espora y se encuentra de manera mayoritaria en las esporas de *P. verrucosum*, *P. citrium*, *P. expansum*. Los efectos de esta micotoxina son alteraciones en la función mitocondrial, produciendo una disminución del contenido de ATP (Soriano *et al.*, 2007).

Legislación

Uno de los componentes esencial de todo sistema moderno de control de los alimentos es el establecer leyes y reglamentos sobre la alimentación, estas deben de ser pertinentes y aplicables. Muchos países tienen una legislación alimentaria inadecuada, lo que merma la eficacia de todas las actividades de control de los alimentos llevadas a cabo en el país. La responsabilidad máxima del control de los alimentos es imponer las leyes alimentarias de protección al consumidor frente a alimentos peligrosos, impuros y fraudulentamente presentados, prohibiendo la venta de alimentos que no tienen la naturaleza, sustancia o calidad exigidas por el comprador (FAO/OMS, s.f).

Inocuidad y calidad alimentaria

La inocuidad de los alimentos hace referencia a todos los riesgos, que puedan afectar a los alimentos, de manera que estos sean nocivos para la salud del consumidor, algunos de los riesgos pueden ser estado de descomposición, contaminación por suciedad, decoloración y olores desagradables (FAO/OMS 2003).

Por otra parte, la calidad es vista como una herramienta para favorecer la seguridad de los alimentos, ya que puede prevenir apariciones de intoxicaciones alimentarias para el consumidor (Cameán, 2012)

La contaminación de los alimentos, puede tener como consecuencia su deterioro al originar una serie de cambios físicos y químicos acompañados de olores y sabores anormales. De mayor importancia aún, es la capacidad de ciertos hongos de producir metabolitos tóxicos para el hombre y los animales utilizando como sustrato dichos alimentos (Pascual, 2005)

Con el propósito de enfrentar con una mayor competitividad a la globalización de los mercados, surgen los sistemas de control de la higiene y calidad de los productos alimenticios (IICA, s.f). Consecuentemente, la inocuidad es un atributo del producto, el cual no debería de cuestionarse convirtiéndose en un derecho del consumidor (FAO, 2007).

Algunos de los factores que contribuyen a posibles riesgos de los alimentos se encuentran las prácticas agrícolas, falta de higiene en las fases de la cadena alimentaria, falta de controles preventivos en las operaciones de elaboración y preparación de los alimentos, utilización inadecuada de productos químicos, contaminación de materias primas, ingredientes, el agua, un almacenamiento deficiente y en malas condiciones, etc. (FAO/OMS, s.f).

Las preocupaciones concretas sobre los riesgos alimentarios se han centrado en general en los siguientes aspectos: Riesgos microbiológicos; residuos de plaguicidas; utilización inadecuada de los aditivos alimentarios; contaminantes químicos, incluidas las toxinas biológicas, y adulteración (FAO/OMS, s.f).

APPCC

El Sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC), es un instrumento que permite identificar y evaluar peligros específicos y medidas para su control, con la finalidad de garantizar la inocuidad de los alimentos, estos sistemas se centran en la prevención. Dicho sistema consiste en siete principios y es compatible con la aplicación de sistemas de gestión de calidad como la serie ISO 9000 (FAO, 1997).

En cuanto a la aplicación de este sistema, la FAO supone que todos los sectores de la cadena alimentaria deben estar operando de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y con los Principios Generales del Codex de Higiene de los Alimentos y la capacidad que tenga un sector industrial para apoyarse o aplicar el sistema APPCC dependerá del grado en que se haya adherido a tales prácticas (FAO, sf).

Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y Normas Mexicanas (NMX)

Las Normas Oficiales Mexicanas son requisitos obligatorios prescritos por la ley. En el ámbito sanitario para la inocuidad de todos los alimentos de consumo humano (productos de pesca, alimentos para lactantes, cacao, chocolate y derivados, productos fermentados y acidificados, etc.) es la Secretaría de Salud quien las publica a través del Diario Oficial de la Federación; actualmente se encuentran 46 Normas publicadas (ICO, 2013).

Por otro lado, las Normas Mexicanas son voluntarias de observancia, sirven como referencia en cuanto a reglas, especificaciones y métodos de prueba (ICO, 2013). El cuadro 5 contiene una lista completa de normas NOM y NMX relativas al café:

Cuadro 5.- Normas relativas al café (NOM-NMX) (ICO, 2013)

Código	Descripción
NOM-002-FITO-2000	Por la que se establece la campaña contra la broca del café
NOM-019-FITO-1995	Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del café
NOM-149-SCFI-2001	Café Veracruz: especificaciones y métodos de prueba
NOM-169-SCFI-2007	Café Chiapas: especificaciones y métodos de prueba
NMX-F-013-SCFI-2010	Café puro tostado, en grano o molido, sin descafeinar o descafeinado: especificaciones y métodos de prueba (cancela a la NMX-F-013-SCFI-2000)
NMX-F-107-SCFI-2008	Café verde en sacos: muestreo

NMX-F-129-SCFI-2008	Café verde: preparación de las muestras para su uso en análisis sensorial
----------------------------	---

MXN-F-139-SCFI-2010	Café puro soluble, sin descafeinar o descafeinado: especificaciones y métodos de prueba (cancela a la NMX-F.139-SCFI-2004)
----------------------------	--

NMX-F-158-SCFI-2008	Café verde: inspección olfativa y visual- determinación de defectos y materia extraña
----------------------------	---

NMX-F-162-SCFI-2008	Café verde: tabla de referencia de defectos
----------------------------	---

NMX-F-173-SCFI-2011	Café tostado con azúcar (cancela la NMX-F-173-S-1982)
----------------------------	---

NMX-F-176-SCFI-2008	Café verde de especialidad: especificaciones, clasificación y evaluación sensorial
----------------------------	--

NMX-F-180-SCFI-2010	Café: determinación del contenido de cafeína- método de prueba
----------------------------	--

NMX-F-181-SCFI-2010	Café verde: determinación del contenido de humedad- método de prueba
----------------------------	--

NMX-F-182-SCFI-2011	Café: determinación del contenido de cafeína- método por cromatografía líquida de alta resolución (método referencia)
----------------------------	---

NMX-F-187-SCFI-2012	Café verde: almacenamiento y transporte
----------------------------	---

MXN-F-551-SCFI-2008	Café verde: especificaciones, preparaciones y evaluación sensorial (cancela la NMX-F-551-SCFI-1996)
----------------------------	---

NMX-F-552-SCFI-2009	Café verde descafeinado: especificaciones y métodos de prueba (cancela a la NMX.F.552-SCFI-1998)
----------------------------	--

NMX-F-586-SCFI-2008	El café y sus productos: vocabulario- términos y definiciones
----------------------------	---

NMX-F-593-SCFI-2013 Café verde y tostado: determinación de la densidad aparente por caída libre de granos enteros de café- método de rutina

PROY.NMX-F-190-SCFI-2013 Café tostado molido: determinación del contenido de humedad- método Karl Fischer (método de referencia)

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se realizaron muestreos en nueve tiendas de autoservicio, pertenecientes a tres cadenas comerciales, y una tienda dedicada a la venta única de café en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, de las cuales se adquirió un total de diecisiete muestras de café en grano comercial. Ver cuadro 6.

Cuadro 6.- Tiendas de autoservicio visitadas y número de muestras obtenidas

Tienda de autoservicio	N° de muestras
1	9
2	3
3	1
4	4

En la tienda de autoservicio número uno, la presentación de cuatro de las muestras colectadas era al alto vacío, mientras que las cinco restantes se encontraban en contenedores de plástico y vendidas a granel; el café recolectado en la tienda número dos la venta es a granel; la presentación de la muestra recolectada en la tienda de autoservicio número tres era al alto vacío, al igual que las muestras colectadas en la tienda de autoservicio número cuatro.

Aislamiento

El aislamiento consistió en una selección aleatoria de 16 granos de café de cada muestra, de acuerdo a la metodología de Ochoa *et al.* (2012); Los granos de café fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos, enjuagados tres veces en agua destilada estéril y secados con papel estéril, se sembraron en cajas Petri con medio PDA, 4 granos por caja; las placas fueron identificadas de acuerdo a la muestra colocada, para posteriormente ser incubadas a $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ por un periodo de siete a quince días, dependiendo del desarrollo del hongo. A partir de los granos sembrados se observó el micelio del hongo.

En función de los tipos y coloraciones de micelio desarrollado fue el número de explantes que se tomaron, esto con la finalidad de obtener un cultivo puro; el cual se tomó con ayuda de un sacabocados, extrayendo del borde de la colonia, sembrándolo en otra placa de Petri con medio PDA, e incubado a una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$, para posteriormente realizar la identificación del hongo.

Identificación de género

Las muestras se identificaron morfológicamente observándose la presencia de estructuras con ayuda del microscopio (Olympu CX12LED ®) e identificadas con base en las claves de Barnett y Hunter (1998).

Identificación molecular

La extracción de ADN se realizó con base a la metodología propuesta por Doyle y Doyle (1990). De las muestras obtenidas se hizo un raspado de micelio, el cual se colocó en un mortero para macerar el Buffer de lisis (Tris HCl a una concentración de 100mM y pH de 8, EDTA a 50mM y pH de 8.5, NaCl a 50 mM y pH de 8.5 y 2% de SDS). El resultado de dicha maceración se vació en tubos Eppendorf, posteriormente se agregó cloroformo-alcohol isomilico 24:1, agitando durante un minuto con ayuda de vortex, en seguida se centrifugo a una velocidad de 12,000 rpm, este proceso se realizó durante 15 minutos. La fase acuosa se colocó en un tubo Eppendorf agregándole alcohol isopropilico y se incubó en hielo 10 minutos, pasando dicho tiempo nuevamente se centrifugo por diez minutos a 12,000 rpm.

Con lo anterior se llegó a la formación de una pastilla de ADN; el alcohol fue retirado y se procedió al lavado de la pastilla con etanol, posteriormente fue retirado el etanol y puesta a secar en papel secante. Cuando la pastilla estaba completamente seca se diluyo en agua inyectable, esta actividad fue realizada con ayuda de un vortex.

La visualización del ADN se realizó mediante electroforesis, en gel de agarosa al 2%, teñido con Buffer de carga Gelred (GenScript®) y con luz ultravioleta con ayuda del fotodocumentador (MultiDoc-T Digital Imagin System).

Para llevar a cabo el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se efectuó una mezcla de acuerdo a las recomendaciones del fabricante de la Taq Master Mix 2x (GenScript®), se utilizaron 1µl de los indicadores de secuencia ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), 2µl de ADN para aforar con agua a un volumen total de 30µl por muestra; Posteriormente, se efectuó la PCR en un termociclador (Axygen Maxygene), de acuerdo a las condiciones presentadas en el cuadro 7.

Cuadro 7.- Condiciones utilizadas en la PCR

	1 ciclo		30 ciclos			1 ciclo	
Temperatura	94°C	95°C	56-60 °C	72°C	72°C	4°C	
Tiempo	5 Min	10 Seg	30 Seg	2 Min	5 Min	∞	

Los productos de la PCR, fueron visualizados mediante electroforesis, como anteriormente se menciona. El producto de la PCR se secuenció en una dirección del 5'- 3' y 3'-5' en el UA-LAB Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario. Los pares de bases obtenidas por la PCR se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) mediante el programa BLAST.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Se obtuvieron un total de 24 cepas aisladas, las cuales se identificaron morfológicamente a género. Se observó la estructura morfológica característica de los géneros *Penicillium*, *Alternaria* y *Rhizopus*. En las cepas identificadas con el género *Penicillium*, microscópicamente se observaron conidios con una estructura ramificada simulando un pincel, con terminaciones ovals en cadena, las cuales son las formadoras de las fiálides; en la observación macroscópica eran de color verde grisáceo, con una zona radial color blanco la cual con el desarrollo del hongo se volvió grisácea. Una de las cepas aislada presentó las características del género *Alternaria*, se observó al microscopio conidios septados de forma transversal, con terminaciones puntiagudas y de tonalidades marrones; macroscópicamente se observaba con una coloración verde con tonalidades marrón y una zona radial de un verde más claro que la zona céntrica (cuadro 8).

Cuadro 8.- Identificación morfológica a género

Clave de la muestra	Identificación molecular (Género)
061805-1	<i>Penicillium</i>
06902	<i>Penicillium</i>
061813-1	<i>Penicillium</i>
061813-2	<i>Penicillium</i>
061805-2	<i>Penicillium</i>
061805-3	<i>Penicillium</i>
06902	<i>Penicillium</i>
061813-3	<i>Penicillium</i>
061802	<i>Alternaria</i>
061805-4	<i>Penicillium</i>
06988-2	<i>Penicillium</i>
06977-1	<i>Penicillium</i>
061802	<i>Penicillium</i>
061889-2	<i>Penicillium</i>
06977-3	<i>Penicillium</i>
06901-2	<i>Rhizopus</i>
06901-2	<i>Penicillium</i>
061013	<i>Penicillium</i>
06977-1	<i>Alternaria</i>
06901-2	<i>Rhizopus</i>

06902	<i>Penicillium</i>
061813-1	<i>Penicillium</i>
061813-2	<i>Penicillium</i>
061805-2	<i>Penicillium</i>

En la figura 8 se muestra la estructura del hongo de género *Penicillium*, observando la hifa, la ramificación de los conidioforos, las fiálides y la formación de las cadenas de conidias ovales.

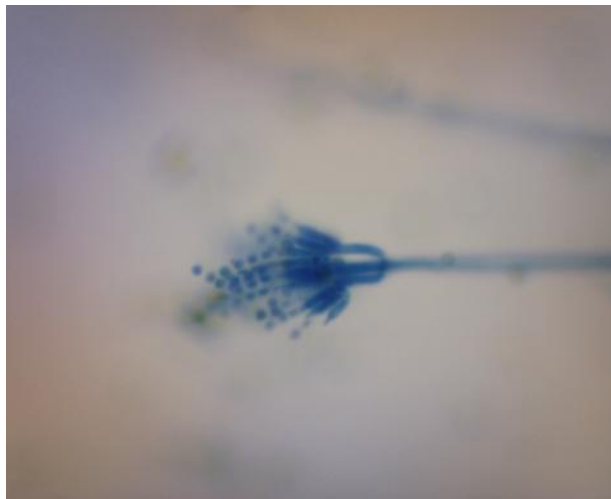


Figura 8.- Fotografía de *Penicillium* al microscopio



Figura 9 Fotografía de *Alternaria* al microscopio

La extracción de ADN se realizó a cinco de las cepas representativas del total aisladas (Cuadro 9). Los resultados de la extracción de ADN, se visualizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Ver figura 10).

Cuadro 9.- Muestras a las cuales se realizó la extracción de ADN

Clave de identificación de cada muestra	Identificación molecular (Género)
061805-1	<i>Penicillium</i>
061813-2	<i>Penicillium</i>
061805-2	<i>Penicillium</i>
061805-3	<i>Penicillium</i>
061813-3	<i>Penicillium</i>

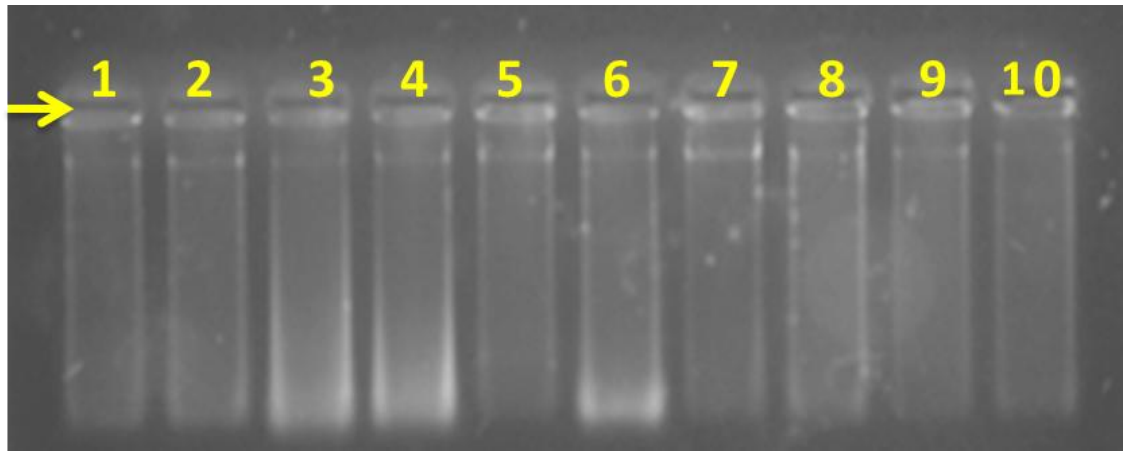


Figura 10.- Visualización de ADN. 1 y 2 muestra 061805-1; 3 y 4 muestra 061813-2; 5 y 6 muestra 061805-2; 7 y 8 muestra 061805-3; 9 y 10 muestra 061813-3.

En la figura 11 se muestra la amplificación de las 5 muestras por medio de la técnica ITS – PCR, donde los productos fueron amplificados a 600 pb aproximadamente.

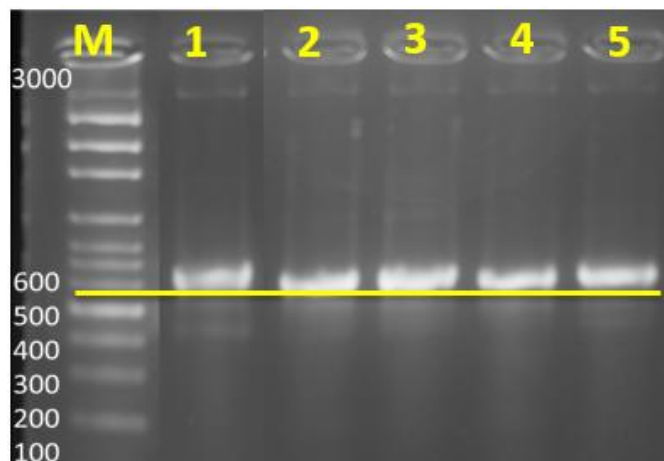


Figura 11.- Visualización de la amplificación por PCR. 1 muestra 061805-1; 2 muestra 061813-2; 3 muestra 061805-2; 4 muestra 061805-3; 5 muestra 061813-3.

Se realizó la secuenciación a las muestras amplificadas y al comparar la secuencia de cada uno de los aislamientos con las reportadas en el banco de genes National Center for Biotechnology Information (NCBI), estas correspondieron al género establecido en este trabajo, y se determinó a nivel de especie (Cuadro 10).

Cuadro 10.- Clasificación molecular de acuerdo a la comparación de secuencias con NCBI

Clave de la muestra	Especie identificada	IS (%)	Número de acceso	Fuente del aislado	Origen
061813-2	<i>Penicillium digitatum</i>	97	AJ250546.1	Fruto pos cosecha	España
061805-1	<i>Penicillium digitatum</i>	99	KJ834506.1	Cítricos	Italia
061805-2	<i>Penicillium expansum</i>	99	AY425984.1	Arboles forestales	Brasil
061813-3	<i>Penicillium digitatum</i>	99	KJ834506.1	Cítricos	Italia
061805-3	<i>Penicillium digitatum</i>	99	KJ834506.1	Cítricos	Italia

Discusiones

En los últimos años el aseguramiento de la inocuidad de los alimentos se ha posicionado como una meta a nivel internacional y nacional, debido a los riesgos que se pueden presentar en cualquier fase de producción, desde el establecimiento del cultivo, cosecha, almacenamiento, transporte, y procesamiento. Para la FAO (2007) la inocuidad no es cuestionable, ni un derecho del consumidor, es un atributo del producto.

Dentro de la contaminación de los alimentos se encuentran los hongos filamentosos, Thornton *et al.* (2015) indica que la presencia de estos organismos es causante de enfermedades serias y en ocasiones intratables en humanos y animales, además de las pérdidas económicas que causan por la infección en los cultivos y la desvalorización comercial del producto.

Los granos almacenados son susceptibles a este tipo de hongos debido a las condiciones del almacenamiento; Elegbede (1978) menciona que los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phoma*, *Sporendonema* y algunas especies de *Fusarium* son quienes afectan a los granos almacenados, Pavòn *et al.*, (2012) sugiere que la contaminación fúngica es una de las principales causas de la alteración de los alimentos y la presencia de *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* o *Aspergillus* representan una amenaza para la salud del consumidor dado a la capacidad de producción de compuestos tóxicos para el ser humano. Marin *et al.* (2015) y Rhouati *et al.* (2013) concuerdan con que la presencia de *Penicillium* y *Aspergillus* se puede dar en las plantas como en cereales, siendo los más comunes arroz, soja, café y cacao.

Bryden (2012) alude que la presencia de un hongo no implica la existencia de micotoxinas debido a que la producción de micotoxinas se realiza bajo condiciones específicas de temperatura, humedad y susceptibilidad del producto contaminado.

Pohl *et al.* (2013) expone que al ser el café una bebida de consumo habitual, los compuestos deseables como los tóxicos se deben de mantener vigilados para así garantizar un producto de calidad y seguro para el consumo. Durante el cultivo de la planta, se puede dar la contaminación por hongos, principalmente con especies del género *Fusarium*, *Alternaria* y *Cladosporium* o durante el almacenamiento.

De acuerdo a Lee *et al.* (2015) y Silva *et al.* (2000) durante la fermentación del café, hongos pertenecientes a géneros: *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*, así como bacterias: *Klebsiella*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* han sido detectados en este proceso.

La microbiota presente en granos de café analizados en este trabajo consiste en hongos filamentosos, se detectó la presencia de tres géneros de hongos filamentosos: *Penicillium*, *Alternaria* y *Rhizopus*. De los cuales Alvindia y Acda (2010) hacen referencia a los géneros *Penicillium*, y *Rhizopus* como microbiota del grano de café. Cabe mencionar que el género *Alternaria* tiene la capacidad de producir más de 70 compuestos tóxicos, aunque sólo una pequeña parte son consideradas micotoxinas tales como: Alternariol (AOH), Alternariol monometil éter (AME), Altenueno (ALT), Ácido tenuazónico (TeA), Alvertoxina (ATX), Tentoxina (TEN) (Bottalico, 1998; Ostry, 2008). La exposición a dichas toxinas ha sido relacionada a la aparición de efectos adversos en la salud de personas y animales, algunos de estos componentes son tóxicos en ratas, pollos y cultivos celulares humanos (Sauer *et al.*, 1978); se ha comprobado que extractos de *A. alternata* son mutagénicos en varios sistemas in vitro y cancerígenos en ratas (Scott *et al.*, 1980). Liu *et al.*, (1992), han relacionado el consumo de alimentos contaminados con *A. alternata* con cáncer de esófago. Sin embargo los efectos tóxicos que se pudieran tener por el consumo de micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. Son muy variables ya que dependen del tipo de micotoxina sintetizada (Pavón *et al.*, 2012)

Se identificó a nivel de especie cepas representativas del total obtenidas, sin embargo, la importancia de dichos hongos se debe a la capacidad de producir metabolitos tóxicos para el ser humano (micotoxinas); a pesar no haberse llevado a cabo una cuantificación de dichos metabolitos. Las cepas que se analizaron se identificaron a nivel de especie mediante técnicas moleculares, como *Penicillium digitatum* y *Penicillium expansum*. Las especies de *Penicillium*

identificadas en este trabajo no han sido reportadas en café, no obstante, Arroyo *et al.*, (2014) menciona que la especie *P. expansum* es comúnmente encontrada en manzanas, zumos y derivados, Cardoso *et al.* (2007) reportó encontrar esta especie en arboles forestales. López-García *et al.*, (1999), reportó la presencia de *P. digitatum* en frutos en postcosecha en España, mientras que Visagie *et al.*, (2014) reportó encontrar esta especie en cítricos de Italia.

En cuanto a la producción de micotoxinas por las cepas identificadas Arroyo *et al.*, (2014) menciona que el metabolito que produce *P. expansum* es la patulina, FAO/OMS (1999) designó a este hongo como el principal productor de dicha micotoxina, además afirma que este metabolito es resistente a los tratamientos térmicos. Estudios han comprobado que esta micotoxina es una neurotoxina que puede causar lesiones graves en las vísceras, así como provocar el debilitamiento del sistema inmunológico, daños al sistema nervioso y efectos negativos en el sistema gastrointestinal (FAO,sf; Roussel *et al.*, 2007).

Otra micotoxina producida por el género *Penicillium* es la ocratoxina A, de acuerdo a reportes de Rhouati *et al.* (2013), es una molécula estable, la cual no se destruye bajo condiciones normales de cocción, tostado y fermentación y puede aparecer durante el crecimiento de la planta, en la siembra, almacenamiento o durante el procesamiento del café.

Malir *et al.* (2013) indicó que la ocratoxina A no es degradable al hervido, y que a temperaturas mayores de 250°C durante varios minutos es posible la reducción de concentración hasta un 20% aproximadamente; cabe mencionar que el café durante el proceso de tostado llega a una temperatura de entre los 200°C y los 300°C (Narita *et al.* 2014).

García (2016) reportó un alto número de muestras comercializadas de café tostado contaminadas por micotoxinas con rangos de 0,10 µg/kg hasta 25,86 mg/kg; entre algunas de las micotoxinas reportadas destaca la ocratoxina A (OTA) con valores superiores a los establecidos por la FAO (5,0 µg/kg) en algunas de las muestras.

Otteneder y Majerus (2010) señalan que la presencia de Ocratoxina A en café verde y tostado ha sido reportada de una manera frecuente en la literatura, mientras que Romani *et al.* (2003) mostraron que de 162 muestras de café se presentó ocratoxina A en 106 muestras de café verde.

Skrinjar *et al.* (2013) y Rhouati *et al.* (2013) concuerdan con que algunos de los efectos producidos por la ocratoxina A, tanto en animales como en humanos son nefropatías crónicas, mielotoxicidad, teratotoxicidad, inmunotoxicidad, genotoxicidad y está relacionada con carcinogénesis. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria recomienda una dosis semanal tolerable de 10 ng/kg pc/semana (EFSA, 2006); mientras que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a esta micotoxina del grupo 2B, es decir, como un posible carcinógeno en humanos.

En relación al café, la única micotoxina que cuenta con normativa es la ocratoxina A, para la cual el Codex Alimentarius adoptó un Código de buenas prácticas para la prevención y regulación de esta micotoxina (OMS/FAO, s.f).

CONCLUSIONES

El análisis llevado a cabo en este trabajo logró identificar los hongos asociados al café tostado y mostró la presencia de hongos filamentosos los cuales fueron identificados morfológicamente como *Penicillium*, *Alternaria* y *Rhizopus*.

Mediante técnicas moleculares se identificaron a nivel especie cepas representativas del total de muestras como *Penicillium expansum* y *Penicillium digitatum*.

LITERATURA CITADA

- Alvarado S. M., Rojas C. G. 1994. Cultivo y beneficiado del café. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Alvinda D., Acda, M. A., 2010. Mycoflora of coffee beans in the philippines. J ISSAAS. 16 (2) 116-125.
- AMECAFE. (n.d.) Ficha técnica de Roya del Cafeto. Consulta: 29 de junio de 2016. Disponible en: <http://amecafe.org.mx/downloads/FichaT%C3%A9cnicaRoyadelCafeto.pdf>.
- AMECAFÉ-SIAP. (n.d.). Consulta: 13 de mayo de 2016. Disponible en: <http://amecafe.org.mx/padron-nacional-cafetalero/>
- Arroyo Manzanares N., Perez Huertas J., Gámiza Gracia L., García Campaña A. M. 2014. Control de Micotoxinas en Alimentos. Boletín Graseqa N°7. Universidad de Granada. España
- ASERCA. 2013. Cumbre Latinoamericana del Café, agosto 2013. Consulta: el 08 de junio de 2016. Disponible en: <http://www.mexbest.com/es/eventos-y-misiones-comerciales/cumbrelatinoamericana-del-caf.html>
- Ashby, S.F. 1925. The perfect form of *Stilvum flavidum* Cke. In pure culture. Roy. Bot. Gardens. Kew Bul. Misc. Inf. N° 8: 325-328.
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J. M. Olguin, E., Guiraud, J. P. 2001. Microbiological and biochemistry study of coffee fermentation. *Current Microbiology*. 42, 252-256.
- Avelino, J.; Toledo, J. C.; Medina, B. 1992. El caldo de bordelés y la recepa en el control del ojo de gallo. Memoria Técnica de Investigación en Café 90-91.

- Badui, S. 1993. *Química de los Alimentos*. Pearson Education. México. 736pp.
- Bartra, A. 2006. *Virtudes económicas, sociales y ambientales del café certificado*. El caso de la coordinadora estatal de productores de café de Oaxaca. En B. Canabal, G. Contreras, & A. León, *Estrategias Económicas y Procesos Culturales* (pág. 436). México DF: Plaza y Valdés.
- Batista, L. R. Chalfoun S. M., Silva, C. F., Cirilo, M., Varga, E. A., Prado, G., Schwan, R. F., 2009. Ocratoxina A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control* (20): 784-790.
- Bonilla, J.C. 1979. Estudio de la epifitología del ojo de gallo causada por el hongo *Omphalia flavida*. Instituto Salvadoreño de investigaciones en Café 3: 42-45.
- Buller, A. H. R. 1934. *Omphalia flavida*, a gemmiferous and luminous leaf-spot fungus. In *Researches on fungi*. Vol VI: 397-443, Longmans, Green & Co., Londres, 513p.
- Cabañes, F.; Abarca, L.; Bragulat, M.; Catellá, G. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Especies productoras de micotoxinas. Díaz de Santos. España. p 29-61. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Cameán, A. M., Repetto M. (Edt.), 2012. *Toxicología alimentaria*. Madrid, España. 273-284
- Cano-Flores, M., Delfin-Pozos, F. L., Díaz-Cerón, A. M., García-López, T., González-Hernández, R., Meneses-Aguirre, B., Oliva-Zárate, M., Quintana-Rodríguez, J. T. Ramírez-Juárez, J., Ramírez-Sánchez, J., Romero-Pedraza, E., y Sesmas-Muñoz, B. 2004. *Estudio de mercado sobre el consumo de café en la ciudad de Xalapa, Veracruz*. Revista IIESCA. Universidad Veracruzana (2):108-127.
- Castaño, J. J. 1956. Mancha de hierro del cafeto. *Cenicafe* 7 (82): 313-327.

- Castro F, R, Charles E, H, and Barreto, RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. *Tropical Plant Pathology*, 34 (2):108-113.
- CEDRSSA. 2014. *Producción y mercado de café en el mundo y en México* (available at file:///F:/Reporte_Producci%C3%B3n_y_mercado_de_caf%C3%A9_-_Cedrssa_2014.pdf)
- CEFP. 2001. El mercado del café en México. Consulta: 30 de mayo de 2016. Disponible en: <http://www.cefp.gob.mx/intr/edocumentos/pdf/cefp/cefp0542001.pdf>
- Centro de Comercio Internacional, 2011. *Guía del exportador del café*, (3ra ed.) 4-6
- Cheeke PR. *Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants*. Interstate Publishers, Inc. Danville, IL 1998.
- Doyle, J. J., J. L. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- EFSA, European Food Safety Authority, 2006. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A in food. *TheEFSA Journal*. 365, 1-56
- Elegbede J.A. 1978. *Fungal and mycotoxin contamination of Sorghum during storage*. M.sc thesis submitted to department of Biochemistry, Ahmadu Bello University, Zaria.
- FAO. 2004. *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003* (available at <http://www.fao.org/3/a-y5499s.pdf>).

- FAO. 2006. Un café más sano. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. Consulta: 29 de mayo de 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0607sp1.htm>
- FAO/OMS. (n.d.). Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: Directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 76. [En línea]. Roma: FAO, 2003.
- FAO/OMS. 1999. Comisión del codex alimentarius, COMITE DEL CODEX SOBRE ADITIVOS ALIMENTARIOS Y CONTAMINANTES DE LOS ALIMENTOS: DOCUMENTO DE SINTESIS RELATIVO A LA PATULINA. 31ª reunión La Haya, Países Bajos. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFAC/ccfac31/fa99_16s.pdf
- Fernandez B., O.; Cadena G., G.; López D., S.; Buitrago J., H. L.; Arango B., L. G. 1982. La mancha de hierro del cafeto *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke, biología, epidemiología y control. In: Colloque Scientifique International Sur le Café, 10. Salvador, octubre 11-14.
- FIRA. 2015. Panorama Agroalimentario, café. Consulta: 26 de septiembre de 2016. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61949/Panorama_Agroalimentario_Caf__2015.pdf.
- Flores, F. 2015. La producción de café en México: Ventana de oportunidad para el sector agrícola de Chiapas, Innovación más Desarrollo vol. IV, N°7, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- García-Moraleja, A., Font, G., Mañes, J., Ferrer, M., 2015b. Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee. *Food Control*. 57, 282-292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.031>.
- Gekle M, Schwerdt G, Freudinger R, Mildenerberger S, Wilflingseder D, Pollack V *et al*. Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MCDK

cells at nanomolar concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 837-44.

Gómez, Gabriel, *Cultivo y beneficio del café* Revista de Geografía Agrícola [En línea] 2010, (Julio-diciembre): [Fecha de consulta: 30 de mayo de 2016] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=75726134008>> ISSN 0186-4394

ICO, Historia del café. Consulta: 25 de mayo 2016. Disponible en: http://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp

INEGI. 2014. Encuesta Nacional Agropecuaria 2014. Consulta: 30 de abril de 2016. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/Proyectos/encuestas/agropecuarias/ena/Ena2014/default_t.aspx.

Ito, Y.; Peterson, W.; Wicklow, D.; Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105: 233-239.

J.M. Soriano del Castillo (Ed.). "Micotoxinas en alimentos". Díaz de Santos, Madrid, 2007.

Kurtzman, C.; Horn, B.; Hesseltine, C. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxina producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53:147-158.

Läderach, P., J., Lau, C., Eitzinger, A., Ovalle, O., Beca, M., Jarvis, A., Lundy, M. 2011. *Café mesoamericano: Desarrollo de una estrategia de adaptación al cambio climático* CIAT Políticas en Síntesis N° 2. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 4.

Lee, T. P., Saad, B., Khayoon, W. S., & Salleh, B. (2012). Molecularly imprinted polymer sorbent in micro-solid phase extraction of ochratoxin A in coffee, grape juice and urine. *Talanta*, 88, 129-135.

- Liu G, Qian Y, Zhang P, Dong W, Qi Y, Guo H. Etiological role of *Alternaria alternata* in human oesophageal cancer. *Chin Med J* 1992; 105: 394-400.
- López de Cerain A, Jimenéz AM, Ezpeleta O, Bello J. Efectos tóxicos de la Ocratoxina. *Rev Toxicol* 2000; 17: 61-69.
- López de Cerain A. Ocratoxina A: Exposición en España y nuevos aspectos sobre su toxicidad. *Rev Toxicol* 2003; 20: 72-3.
- Malir F., Ostry V., y Novotn E., 2013. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 32(2): 19–33
- Mariscal, A. 2011. El café orgánico de Chiapas crece a contracorriente y sin incentivo. CNN México. Consulta: el 29 de junio de 2016. Disponible en: http://www.ecosur.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=1184:el-cafeorganico-de-chiapas-crece-a-contracorriente-y-sin-incentivo&catid=154:ecomedios&Itemid=1138&lang=tze
- Marques-Villa, D., Vínicus-Pereira, G., Ferreira-Silva, C., Roberto-Batista, L., Freitas-Schwan R. 2010. Molecular ecology and polyphasic characyerización of the microbiota associated with semi-dry precessed coffe (*Coffea arabica* L.) *Food Microbiology*. (27): 128-1135.
- Martínez-Larrañaga MR, Anadón A. Micotoxinas. En: Cameán AM, Repetto M, (Edt.). *Toxicología alimentaria*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. 2006; 289-07.
- Murray, P.R.; Pfaller, M.A.; Rosenthal, K.S. 2006. *Microbiología médica*. 5ta ed. Elsevier. 974 p.
- Narita Y., e Inouye K., 2014. Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Research International*, 61, 16–22.
- Ochoa Fuentes, Yisa Maria; Landeros Flores, Jeronimo; Olalde Portugal, Victor; Hernández Camacho, Sandra; Rodríguez Guerra, Raúl; Gallegos

- Morales, Gabriel; Cerna Chávez, Ernesto; Delgado Ortiz, Juan Carlos. 2012. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Micología*, Sin mes, 27-31.
- OIC, 2013. Normas nacionales de calidad. Comité de promoción y desarrollo del Mercado. 6ª reunión, Belo Horizonte, Brasil. Consulta: 29 de mayo de 2016. Disponible en: <http://www.ico.org/documents/cy2012-13/pm-29c-quality-standards.pdf>
- Ominski, K.H., Marquardi, R.R., Sinha, R.N and Abramson, D. 1994. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Miler, J.D and Trenholm, H.L (1994). *Mycotoxins in grains: Compounds other than aflatoxins*. Eagan Press, St. Paul Minnesota, USA. 287-314.
- OMS. 2002. Estrategia Mundial de la OMS para la Inocuidad de los Alimentos: alimentos más seguros para una mejor salud. Programa 2002 de Inocuidad de los Alimentos. Organización Mundial de la Salud (OMS), Ginebra, Suiza.
- Pascual, M.R. (Edt.), 2005. *Enfermedades de origen Alimentario: su supervisión*. España. 95-100.
- Pascual, M.R. 2005. Enfermedades de origen alimentario: Su prevención. Publicado por Ediciones Díaz de Santos. 177p.
- Pavón Moreno M.Á., González Alonso I., Martín de Santos R., García Lacarra T., 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. *Nutrición Hospitalaria*, 2012; 27 (6), 1772-1781pp.
- Perrone, G. Susca, A., Cozzi, G. Ehrlich, K, Varga, J., Frisvad, J. C. Meijer, M., Noomin, P., Mahakarchnakul, W., Samson, R. A. 2007. Biodiversity of

- Aspergillus in some important agricultural products. *Studies in Micology*, 59:53- 66.
- Peterson, S.; Ito, Y.; Horn, B.; Goto, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689-703.
- RASFF - Food and Feed Safety Alerts (n.d.) Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm.
- Review of the occurrence of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A insome agricultural products. *Acta Periodica Technologica*, (44), 103-113.
- Rhouati A., Yang C., Hayat A., y Marty J.L., 2013. Aptamers: A Promising Tool for Ochratoxin A Detection in Food Analysis. *Toxins*, 2013, 5, 1988-2008.
- Robles, H. 19 2011. Los productores de café en México problemática y ejercicio del presupuesto. *Mexican Rural Development Research Reports*, N° 14. Wilson Center.
- Romani S., Pinnavaia G.G., y Dalla Rosa M. 2003. Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5168–5171.
- Sauer DB, Seitz LM, Burroughs R, Mohr HE, West JL, Milleret RJ, Anthony HD. Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. *J Agric Food Chem* 1978; 26: 1380-1383.
- Scott PM, Stoltz DR. Mutagens produced by *Alternaria alternata*. *Mutat Res* 1980; 78: 33-40
- Škrinjar M., Vesković-Moračanin S., Blagojev N.T., ŠošoV.M., y Suturović I.Z., 2013.

- Soliman, K. M. 2002. Incidence, level, and behavior of aflatoxinas during coffee bean roasting and decaffeination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 7477-7481.
- Soriano, M.2007. *Micotoxinas en alimentos*. Editorial Díaz de Santos, España. 313-318.
- Studer-Rohr I, Dietrich DR, Schlatter C. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of Ochratoxin A plasma levels in humans. *Arch Toxicol* 2000; 74: 499-510.
- Temis-Pèrez A. L.,López-Malo Vigil A., Sosa-Morales M. E. 2011. *Producció n de café (Coffea arabica L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 5 – 2: 54-74.
- Vargas, E. 1984. Interacción de tratamiento biológico y químico en el combate del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cafeto. *Agron. Costarr.* 8: 91-97.
- Wellman, F. L. 1950. Dissemination of *Omphalia* leaf spot of coffee. *Turrialba* 1: 12-27.

APÉNDICE

Apéndice 1.- Secuencias de ADN para cada una de las muestras

Muestra 061813-2 identificada como *Penicillium digitatum*.

ACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTACTGGCCGCCG
GGGGGCTCACGCTCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGA
TTGCAGTCTGAGTGAAAACGAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATC
GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCGATCCCGGGGGACGG
GCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCC
GCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCTGCCGATCAACCCCAAATTTTAAATCCAGGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGGATAC

Muestra 061805-1 identificada como *Penicillium digitatum*

ACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTACTGGCCGCCG
GGGGGCTCACGCTCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGA
TTGCAGTCTGAGTGAAAACGAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATC
GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCGATCCCGGGGGACGG
GCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCC
GCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCTGCCGATCAACCCCAAATTTTAAATCCAGGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG

Muestra 061805-2 identificada como *Penicillium expansum*

CCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGG
GGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATT
GAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGA
GTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT
TGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGG

CCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCG
CTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGA
TCAGGTAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC-GGAGGAA

Muestra 061813-3 identificada como *Penicillium digitatum*.

ACCTCCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTACTGGCCGCCG
GGGGGCTCACGCTCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGA
TTGCAGTCTGAGTGAAAACGAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATC
GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCGATCCCGGGGGACGG
GCCCCAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCC
GCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCTGCCGATCAACCCAAATTTTTAATCCAGGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG

Muestra 061805-3 identificada como *Penicillium digitatum*.

ACCTCCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTACTGGCCGCCG
GGGGGCTCACGCTCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGA
TTGCAGTCTGAGTGAAAACGAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATC
GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCGATCCCGGGGGACGG
GCCCCAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCC
GCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCTGCCGATCAACCCAAATTTTTAATCCAGGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG