



Escuela Superior Politécnica del Litoral
INSTITUTO DE TECNOLOGIAS

PROGRAMA DE TECNOLOGIA EN ALIMENTOS
INFORME DE PRACTICAS PROFESIONALES
PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE:
TECNOLOGO EN ALIMENTOS

REALIZADO EN:

E L C A F E S. A.

A U T O R :

Oscar Daniel Castro Romero

MSc. MARIA FERNANDA MORALES

Profesora Guía

MBA. MARIELA REYES

Profesora de Segunda Revisión

AÑO LECTIVO

2004 - 2005

Guayaquil

Ecuador

T
663.93
CAS

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL



INSTITUTO DE TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

INFORME DE PRÁCTICAS PROFESIONALES

Previo a la obtención del Título de Tecnólogo en Alimentos.

Realizado en:
EL CAFÉ S. A.



Autór:
Oscar Daniel
Castro Romero

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Msc. María Fernanda Morales".

Profesor Guía:
Msc. María Fernanda Morales

A handwritten signature in black ink, appearing to read "MBA. Mariela Reyes López".

Profesor Segunda Revisión:
MBA. Mariela Reyes López

AÑO LECTIVO

2004

2005

Guayaquil, 31 de Diciembre de 2004

Msc.
Maria Fernanda Morales.
Coordinadora del PROTAL
En su despacho.-

De mis consideraciones.

Yo, Oscar Daniel Castro Romero estudiante del Programa de Tecnología en Alimentos-PROTAL, con número de matrícula 199902826, con C. I. No. # 0918817941. Indico que la PRACTICA PROFESIONAL fue realizada en la Empresa EL CAFÉ S. A., en el área de Investigación y Desarrollo, efectuada desde el 17 de Abril del 2004 hasta el 16 de Junio del presente año.

Por la favorable acogida a la presente, quedo de Ud. muy agradecido.

Atentamente,



Oscar Castro Romero
C. I. No # 091881794-1

Guayaquil, junio 16 del 2004

CERTIFICADO

Por medio del presente certificamos que la Sr. Oscar Daniel Castro Romero, cuyo número Cédula de Identidad es 0918817941, realizó sus prácticas académicas en el área de Investigación y Desarrollo del Departamento de Control de Calidad, desde el 17 de abril del 2004 hasta el 16 de junio del presente año destacándose por su esforzado trabajo, iniciativa, interés en la investigación y buenas relaciones con sus compañeros de trabajo.

Certificamos que esta información es veraz y la Sr. Castro Romero puede hacer uso del mismo como crea conveniente.

Atentamente,



Carlos Bucaram Carbo
Jefe de Investigación y Desarrollo, Guayaquil
Compañía de Elaborados de Café ELCAFÉ C.A.
Grupo Noboa



EVALUACION DEL PRACTICANTE

NOMBRE DEL PRACTICANTE: Oscar Daniel Castro Romero
DENOMINACION DEL CARGO: Asistente de Investigación y Desarrollo
FECHA: Junio 7 del 2004

A. Asigne una calificación entre 1 al 10 en cada uno de los siguientes aspectos. Si alguno no es aplicable, por favor no lo califique.

1.- Interés en el trabajo	-----	9
2.- Conocimientos	-----	8
3.- Organización	-----	8
4.- Habilidad para aprender	-----	8
5.- Creatividad	-----	9
6.- Puntualidad	-----	7
7.- Cumplimiento de las normas de seguridad	-----	7
8.- Cantidad de trabajo (rendimiento)	-----	8
9.- Relaciones con el personal	-----	9
10.- Habilidad para comunicarse	-----	9
11.- Responsabilidad	-----	9
12.- Trabaja bajo presión	-----	9

B. MARQUE CON UNA CRUZ

1.- Durante el desarrollo de la práctica el estudiante acogió favorablemente críticas y sugerencias.

Siempre A menudo Rara Vez ----- Nunca -----

2.- De los 30 días hábiles inasistió al trabajo?

0 - 10% ----- Más del 10% -----

3.- La jornada de trabajo semanal fue de:

5 días ----- 6 días -----

4.- El promedio de horas trabajadas por día fue:

Menos de 6 horas ----- 6 - 8 horas -----

C. COMENTARIOS ADICIONALES:

D. LLENADA POR: Carlos Bucaram Carbo

CARGO: jefe Inv. y Desarrollo **IRMA Y SELLO:**

NOMBRE DE LA EMPRESA: ELCAFE C.A. **TELF.** 2-246058 xT. 246

INDICE

	Página
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN.	9
DETALLE DEL TRABAJO REALIZADO.	10
ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA:	11
I. Historia de la empresa-El CAFÉ S. A.	11
II. Localización de la Empresa-EL CAFÉ S. A.	12
III. Mercado al que se destina-EL Café S. A.	13
IV. Organigrama de la Empresa-EL CAFÉ S. A.	14
DIAGRAMA DE PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL CAFÉ.	15
I. Descripción del proceso para la elaboración de los tipos café (“Spray-Dried”; “Aglomerado”; “Liofilizado”).	16
<i>a) Limpieza</i>	16
<i>b) Almacenamiento.</i>	16
<i>c) Tostado.</i>	16
<i>d) Mezclado</i>	16
<i>e) Extracción</i>	16
<i>f) Filtración</i>	16
<i>g) Centrifugación</i>	16
<i>h) Evaporación</i>	17
<i>i) Filtración</i>	17
<i>j) División</i>	17
<i>k) Secado</i>	17
<i>l) Empacado para Café “Spray Dried”.</i>	17
<i>Café Aglomerado. (Ver anexo #)</i>	
<i>m) Aglomerado</i>	17
<i>n) Zaranda</i>	17
<i>o) Empacado</i>	17
<i>Café Liofilizado. (Ver anexo #)</i>	
<i>m) Extracto</i>	17
<i>n) Túnel de Enfriamiento.</i>	18
<i>o) Molino</i>	18
<i>p) Zaranda</i>	18
<i>q) Bandejas</i>	18
<i>r) Secado</i>	18
<i>s) Empacado</i>	18



Capítulo I. El Café	19
I. Generalidades del café.	19
II. Historia.	19
III. Características Organolépticas entre tipos de café.	19
IV. Zonas Cafetaleras del Ecuador.	19-20
V. Cultivos de café Arábigo.	20
VI. Factores Climatéricos (Pre-Cosecha).	20
a) <i>Precipitación.</i>	20-21
b) <i>Temperatura.</i>	21
c) <i>Temperatura y su relación con el cafeto.</i>	21
VII. Características de los tipos de café.	21-24
VIII. Tipos de café elaborado.	24
a) <i>Café Orgánico.</i>	24
b) <i>Café soluble en polvo atomizado ("Spray-dried").</i>	24-25
c) <i>Café soluble aglomerado.</i>	25
d) <i>Café soluble liofilizado ("Freeze-dried").</i>	25-26
e) <i>Café soluble aromatizado.</i>	26
f) <i>Café descafeinado.</i>	26-27
g) <i>Café tostado y molido.</i>	27
h) <i>Extracto congelado de café.</i>	27
CAPITULO II. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC), PARA ANÁLISIS DE OCRATOXINA-A.	28
I. Generalidades.	28
II. Descripción de Cromatografía Líquida de Alta Resolución-HPLC.	29
III. Separación mecánica empleada en HPLC.	29-30
CAPITULO III. PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA-A, APLICANDO LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC.	31
I. Procedimientos para la preparación de la Solución STOCK (Solución MADRE de Ocratoxina-A).	31-32
II. Procedimiento para la preparación de las soluciones intermedias y soluciones de trabajo de Ocratoxina-A.	32-38
III. Procedimiento para la elaboración de la Curva de Calibración (Áreas de integración de los Estándares de Ocratoxina-A)	38-39
IV. Procedimientos para la preparación de las soluciones requeridas para el análisis de Ocratoxina-A; empleando la técnica de HPLC.	39
<u>Solvente de Extracción.-</u>	39
<u>Solución al 3% de Bicarbonato de sodio.-</u>	39
<u>Solución de Solución Buffer Fosfato-PBS.-</u>	39-40
<u>Fase móvil.-</u>	40
<u>Solución de Di-cromato de potasio.-</u>	40

V. Procedimientos para la preparación de la muestra de café verde para la determinación de Ocratoxina-A.	40-43
VI. Preparación del Equipo HPLC-Cromatografo e Impresora.	43-46
CAPITULO IV.	47
I. Descripción.	47
II. Clasificación.-	47
III. Dosis Letal Media.-	47-48
IV. Condiciones de almacenamiento de la Ocratoxina.	48-49
V. Método invasivo de la Ocratoxina-A.-	49-50
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	54

RESUMEN

El presente informe se lo ha desarrollado en el tema del café. Enfocándose en Investigación y desarrollo de una técnica que permita analizar de forma cuantitativa concentraciones de Ocratoxina-A, siendo una toxina propia presente en el grano de café verde.

Se inicia el informe conociendo aspectos generales de la empresa en el cual ejecute la práctica de la investigación, en este punto conoceremos sobre la historia , localización, mercado destinatario y el organigrama de la Empresa EL CAFÉ S. A., procesadora de café. Siguiendo con nuestra investigación el informe se lo ha desglosado para tener una visión más amplia en cinco capítulos. En los cuales abarcamos temas de mucho interés.

En el primer capítulo, hablaremos sobre el café y su cultivos, así como su clasificación. En el segundo capítulo, se tocara el tema de la Técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución-(HPLC, por sus siglas en inglés), a su vez es subdivido en varias tópicos que describen su función y aplicación. En el tercer capítulo, describiremos los procedimientos requeridos para el análisis de Ocratoxina-A, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución-(HPLC). Que incluye procedimiento para la muestra de café, las soluciones requeridas, los estándares aplicados. En el cuarto capítulo, se expone sobre la micotoxina, que es la Ocratoxina-A, incluyendo su descripción, clasificación, las dosis letal media, condiciones de almacenamiento y el método invasivo en el ser humano.



INTRODUCCION

Las micotoxinas son un grupo muy amplio de metabolismo secundario de origen fúngico caracterizadas por presentar una elevada toxicidad tanto para el hombre como para los animales, toxicidad que puede comprender desde el desarrollo de actividades carcinogénicas, mutagénicas o hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor. Los mohos productores de micotoxinas se encuentran en la mayoría de hábitat y pueden contaminar los alimentos, principalmente los productos agrícolas como el Café, y como resultado de su actividad metabólica acumular en éstos las toxinas.

Para la empresa EL CAFÉ S. A., productora de café. Uno de los parámetros fundamentales que determinan la calidad del producto, es la determinación cuantitativa de concentraciones mínimas en partes por billón (ppb) de la Ocratoxina-A. Por este motivo la empresa designo al Área de Investigación y Desarrollo, la tarea de aplicar una técnica nueva que permita obtener resultados seguros y pueda detectar concentraciones mínimas de parte por millón.

Con la investigación en vivo de esta técnica, determinará un control más estrictos de la materia prima como es el café, por parte de los distribuidores ya calificados por la empresa y de otros destinatarios. Así, como también la emisión de los resultados de análisis de Ocratoxina-A en grano de café verde y en café soluble, en los envíos hacia mercados extranjeros.

DETALLE DEL TRABAJO REALIZADO

Durante el desarrollo de la Práctica Profesional en la Empresa EL CAFÉ S. A., me desempeñe como ayudante en el área de Investigación y Desarrollo. En este lapso la empresa desarrollaba el proyecto de aplicar una nueva técnica para la determinación de la micotoxina, "Ocratoxina-A", mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

La misión fue la de finalizar 60 análisis de Ocratoxina-A, aplicando la Técnica de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución en grano de café verde. Y determinar la recuperación de la toxina conocido como análisis de "SPIKE", para determinar la eficacia del equipo en un 100%. Así, determinar que la técnica y el equipo empleado es válido para las exigencias de los parámetros establecidos por los clientes en el exterior.

Durante los tres meses que duró la práctica se me designó al Ing. Carlos Bucarán, Jefe del Área de Investigación y Desarrollo, como mi jefe inmediato; con el cual se estableció el horario de prácticas siguiente, de lunes a viernes con un horario de 9h00 am. hasta las 18h00 pm., y en el caso de que no se concluyera los análisis, se trabajaba los días sábados, a partir de las 9h00 am. Hasta las 16h00 pm.

El práctica incluía; la elaboración de los estándares, el desarrollo de Curva Estándar, el análisis de Ocratoxina-A, el análisis de recuperación de la Ocratoxina, la limpieza de los instrumentos, equipos y área de trabajo, la evaluación de los resultados, la tabulación de los resultados junto con las especificaciones de producción, y en el caso de un resultado erróneo, desarrollarlo nuevamente.

ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA

I. HISTORIA DE LA EMPRESA - EL CAFÉ S. A.

La empresa EL CAFÉ S. A. división Guayaquil, es una empresa propiamente ecuatoriana, que nació en el año de 1978, donde en sus inicios era conocida como ULTRAMARES Corporación C. A., siendo un fuerte exportador de café en grano. Hoy con más de 60 años de existencia y contando con una vasta experiencia y prestigio en el mercado internacional, es una de las empresas más fuerte del mercado cafetero en el Ecuador.

La Empresa EL CAFÉ S. A., constituida en área de procesadora de café; es parte del gran conglomerado empresarial del Grupo Noboa. Conformada propiamente por Ecuatorianos.

La empresa EL CAFÉ S. A. se caracteriza por ser una empresa ágil, dinámica, altamente profesional y manejar una flexibilidad en el procesamiento del café dependiendo de las exigencias del consumidor. Con un gran conocimiento de la técnica en el proceso de elaboración de café soluble, la empresa EL CAFÉ S. A. le ofrece productos que van desde los más económicos hasta el más fino, cubriendo los requerimientos más competitivos del mercado.

La empresa EL CAFÉ S. A. se encuentra estratégicamente conformada para cubrir las necesidades de consumo del café; tanto a nivel del mercado nacional, como del internacional. Para lo cual posee dos plantas procesadora de café soluble. La primera localizada en Montecristi, al lado de la ciudad portuaria de Manta; cubre las necesidades de consumo nacional. Y la segunda, en Guayaquil, puerto principal; cubre las necesidades de consumo internacional. Ambas plantas se encuentran equipadas totalmente con maquinaria de alta tecnología.

II. LOCALIZACIÓN DE LA EMPRESA - EL CAFÉ S. A.

En la Empresa EL CAFÉ S. A., sus oficinas y planta industrial , en su división Guayaquil. Se encuentra ubicada en la Av. Juan Tanca Marengo Km. 3 ½ Lomas de Prosperina, Primer Pasaje 32 N. O.

La empresa EL CAFÉ S. A., copa aproximadamente un área de 60.000 metros cuadrados. Toda esta área se encuentra seccionada en la siguiente forma; La planta de procesamiento de café soluble en polvo y aglomerado, las cuales se encuentran en una misma superficie, que abarca un área de 9.000 metros cuadrados..

La Empresa EL CAFÉ S. A., cuenta además con un área destinada para ULTRAMAR, la que cuenta con la maquinaria necesaria para el maquilado del café verde. Esta posee un área de 5.500 metros cuadrados. Además, la empresa cuenta con un área para el pesaje de los camiones que transporta el café verde a la planta.

Además, la empresa cuenta con un Departamento de Mantenimiento a la cual a destinado un área para las reparaciones. Posee a su vez un área destinada para el comedor, otra área para enfermería en la cual está destinado un médico y una enfermera titular.

La Empresa además, cuenta con sus oficinas que cubren un área aproximado de 16 metros cuadrados. Y una amplia área de parqueo tanto para personal interno, como visitantes.



III. MERCADO AL QUE SE DESTINA - EL CAFÉ S. A.

En la actualidad la mayor parte de las exportaciones de la Empresa EL CAFÉ S. A., en su división Guayaquil; esta dedicada a abastecer de café a granel a grandes empacadores internacionales, quienes envasan bajo el nombre de sus propias marcas o bajo solicitud del cliente.

Los mercados internacionales del producto son muy variados, abarcan desde Europa Occidental, a países como: España, Inglaterra Italia, Holanda, Alemania y Francia; donde se destina el 28% de su producción lo que constituye 22.821 toneladas anuales.

Mercados de Europa Oriental, con países como: Rumania, Polonia, Ucrania, Rusia, República Checa, Turquía. Los cuales representan el 61%, de su producción lo que constituye 10.704 toneladas anuales.

Mercados de Asia, con países como: Japón, Corea, Singapur y Taiwán. Los cuales representan el 3%, con 1.178 toneladas de café soluble.

Mercados de Continente Americano, con países como: Estados Unidos, Canadá, Perú y Chile. Los cuales representan el 8% de su producción total ,o que constituye 2.897 toneladas.

Dando como resultado un tamaño de producción de 37.600 toneladas anuales de café soluble que la empresa EL CAFÉ S. A., exporta anualmente.

IV. ORGANIGRAMA DE LA EMPRESA - EL CAFÉ S. A.

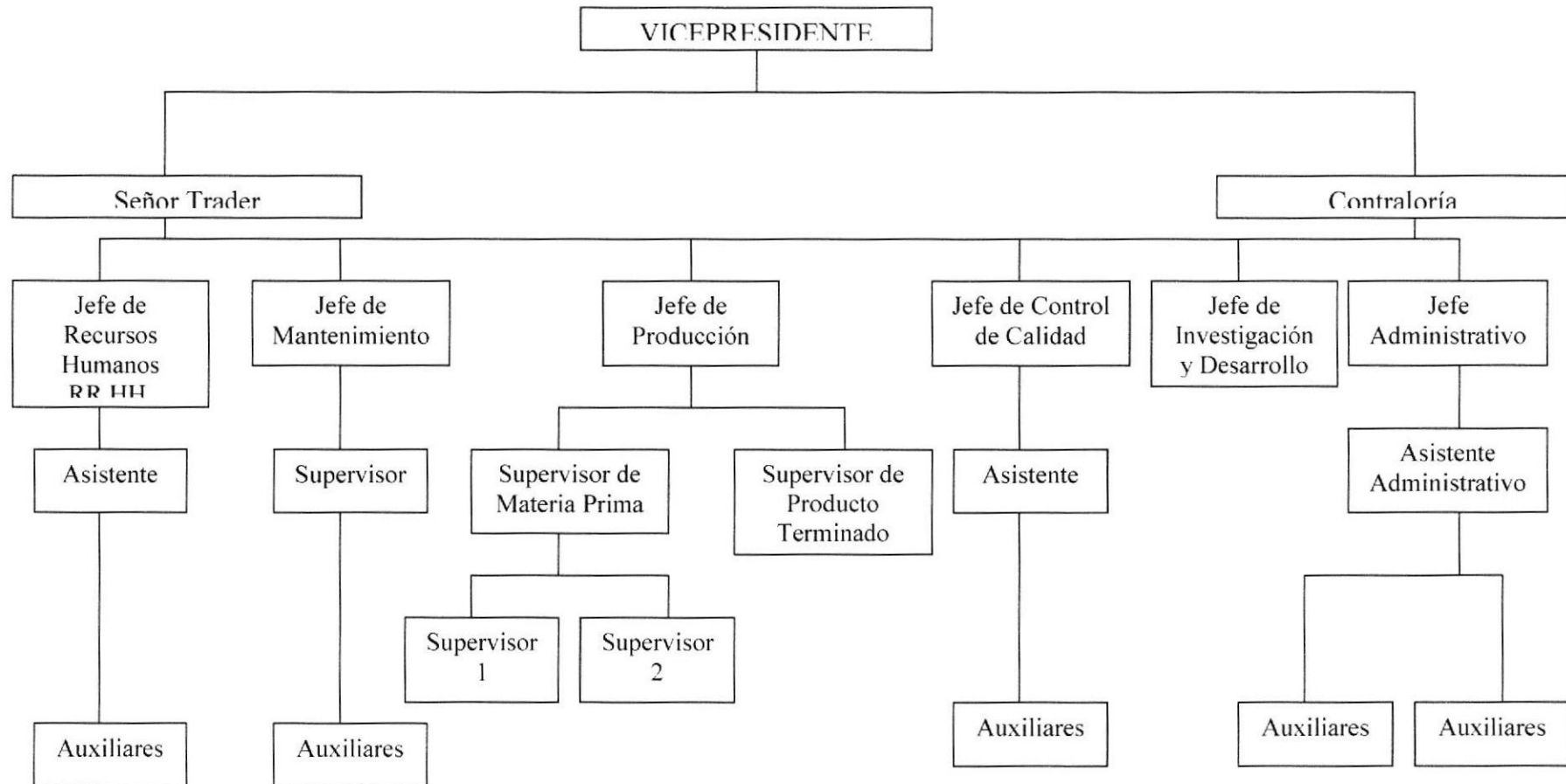
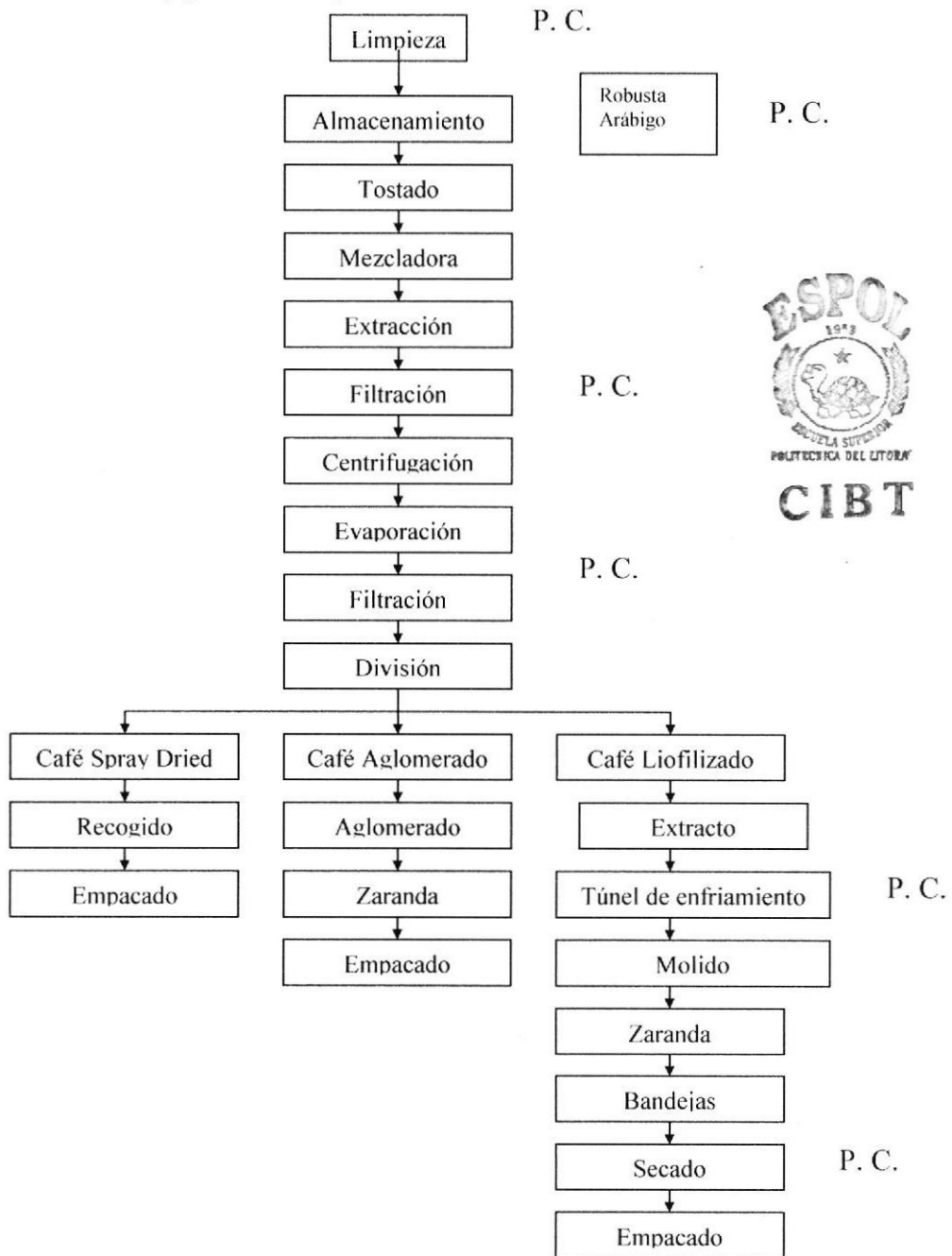


DIAGRAMA DE PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL CAFÉ

Debido a que la Práctica Profesional fue realizada en el Área de Investigación y Desarrollo, no estuvimos en constante contacto con el Área de Producción, y así poder conocer los parámetros de calidad que ellos mantienen por etapa de proceso; sin embargo hacemos referencias en ciertos puntos del informe de los tipos de cafés, las especificaciones técnicas y por ende su proceso.



I. Descripción del proceso para la elaboración de los tipos café (“Spray-Dried”; “Aglomerado”; “Liofilizado”).

El proceso para los tres tipos de café que se elaboran siguen los mismos punto desde el punto *a*), hasta el punto *K*); a partir de este punto se separan los procesos para cada café elaborado.

Café Spray Dried (Ver anexo # 1), Café Aglomerado y Café Liofilizado.

- a) Limpieza.-** Luego de la etapa de selección, el café es clasificado por su tamaño y peso para facilitar su industrialización. En este momento se realiza además un proceso de limpieza de los granos en el cual se extrae del café cualquier materia extraña que pudiera tener.
- b) Almacenamiento.-** Luego de clasificado y limpiado y previo a su tueste, el grano es almacenado por variedades: ROBUSTA, ARÁBIGA: *natural o lavados*.
- c) Tostado.-** La tueste se la realiza de acuerdo a la variedad y a la ruta de producción del blend determinado. Los granos son expuestos a una temperatura de 200°C., centígrados (392°F.) es tostadores industriales cilíndricos. El tiempo de tueste depende del tipo de café.
- d) Mezcladora.-** Luego de tostado, los granos de las distintas calidades y especies son mezclados en proporciones previamente determinadas en la ruta de producción.
- e) Extracción.-** En esta etapa a los granos se les extraen los sólidos solubles mediante un flujo de agua a presión y a temperatura elevada. Al líquido obtenido se lo denomina extracto.
- f) Filtración.-** Se realiza un filtrado para eliminar residuos sólidos.
- g) Centrifugación.-** Se realiza un centrifugado para eliminar los residuos sólidos que puedan estar presentes en el extracto.

- h) Evaporación.-* El agua utilizada para la extracción de los sólidos solubles es eliminada a través de evaporadores, quedando un 43% de sólidos solubles.
- i) Filtración.-* Se realiza un segundo filtrado, para eliminar impurezas que pudieron haber pasado.
- j) División.-* El proceso aquí se divide.
- k) Secado.-* Después de eliminar parcialmente el agua del extracto, es introducido en la torre de Spray (secado) donde se transforma el extracto líquido, en un fino polvo, que es recogido en el fondo cónico del secador en recipientes de acero inoxidable para su posteriormente envasado. El producto final de este proceso es el café en polvo Secado-Spray Dried Coffee.
- l) El producto es recogido y empacado como Café Spray Dried.*

Café Aglomerado. (Ver anexo # 2)

- m) Aglomerado.-* El café soluble en polvo, producto final del proceso “Spray-Dried” es fusionado en el aglomerador mediante agua y vapor. La aglomeración logra que el producto mejore su aspecto visual y que concentre su sabor.
- n) Zaranda.-* En la zaranda se separan las partículas o gránulos de café de acuerdo a su tamaño.
- o) Empacado.-* Finalmente el café aglomerado es recogido y empacado.

Café Liofilizado. (Ver anexo # 3)

- m) Extracto.-* Luego del proceso de evaporación, el extracto líquido de café es conducido por cañerías hacia el área de Liofilizado, donde es depositado en el Túnel de Enfriamiento.

- n) Túnel de enfriamiento.-* En este punto el extracto de café es conducido por una banda de acero por la cual se introduce al túnel de enfriamiento a temperaturas de -50°C (-58°F) durante 30 minutos. Aproximadamente, provocando el congelamiento del extracto de café.
- o) Molino.-* Al finalizar el túnel el extracto congelado es triturado por molinos de diferentes tamaños y convertido en pequeñas partículas de acuerdo a las especificaciones del cliente.
- p) Zaranda.-* Se separan las partículas congeladas de café de acuerdo a su tamaño.
- q) Bandejas.-* Las partículas seleccionadas son colocadas en bandejas (aproximadamente 2.5 kg., en cada bandeja) las cuales son puestas en coches y transportadas e introducidas a las Cámaras de Secado al Vacío.
- r) Secado.-* Introducidas las bandejas en las cámaras, entran en vacío, lo cual produce que el líquido (agua) contenido en el extracto congelado se sublime, es decir pasa de estado sólido a gaseoso, sin pasar por el líquido. El producto final de este proceso es el café Liofilizado o Freeze Dried.
- s) Empacado.-* el café secado es empacado para su transportación.

CAPITULO I

EL CAFÉ.

I. Generalidades del café.-

Todas las bebidas tienen ciertas características tratadas por el calor para adquirir aromas característicos; contienen cafeína; sus aromas son complejos y se deben en parte a los taninos; se beben como infusiones acuosas (o emulsiones acuosas, como el cacao).

El café tiene relevante importancia en los órdenes económico, social y ecológico. Su producción representa ingresos de divisas y sostén económico para 105.271 familias. Por sus características de semi-bosque, los cafetales constituyen hábitat de muchas especies de la fauna y la flora nativas.

II. Historia.-

El Café Robusta se introduce desde Costa Rica al Ecuador en 1951 y 1977.

III. Características Organolépticas entre tipos de café.-

Respeto a los resultados de las evaluaciones sensoriales, se destaca que las características organolépticas: *Aroma, sabor, Acidez y Cuerpo*; son prácticamente similares en las variedades Arábigas. “El tamaño del grano”, mostró un efecto significativo sobre las características organolépticas del *Sabor, Acidez y Cuerpo*.

Los suelos con tendencia a alcalinos pueden afectar a la acidez de la taza. Los altos contenidos de nitrógeno y hierro en los suelos cafetaleros, contribuyen de manera directa a mejorar la acidez de la bebida. El contenido de magnesio favorece las características “*Aroma, Sabor y Cuerpo*” del café, son afectadas por la presencia de altos contenidos de cobre en el suelo.

IV. Zonas Cafetaleras del Ecuador.-

En un proyecto se identificó como Zona de mayor aptitud Agro-Ecológica para producir café “*Gourmet*”, “*Gourmet Orgánico*” y “*Orgánico bajo sombra*”, en los siguientes lugares: Vilcabamba, Celica, Quilanga, Chaguarpamba, Gonzanamá, Paltos, Puerto Quito, Tandopi, Mindo, Chito, Yantzaza, Pallatanga, Columa, Marcabelí y Cascol.

V. Cultivos de Café Arábigo.-

El Café Arábigo “*Coffea Arabica L*” se cultiva en el Ecuador desde altitudes cercanas al nivel del mar hasta los 2.000 metros de altura; distribuidos principalmente en las provincias de: Manabí, Loja, El Oro, Zamora Chinchipe, Pichincha, Guayas, Los Ríos, Bolívar, Imbabura, Esmeraldas y Napo.

Algunas variedades de Café Arábigo como: *Typica* y *Coturra Roja*; se han adaptado y producen bien en las Zonas Tropicales Secas, donde otras especies vegetales no se desarrollan satisfactoriamente. En las Zonas sub.-Tropicales, especialmente hacia las estribaciones occidentales de la Cordillera de los Andes, los cafetales de Arábigo han mostrado un excelente comportamiento productivo y buena calidad de taza.

El Café Robusta “*Coffea Conephora Pieva*”, se cultiva en las Zonas Tropicales húmedas, por debajo de los msnm, principalmente en las provincias de: Esmeraldas, Pichincha (Santo Domingo), Los Ríos, Napo, Sucumbios y Orellana.

VI. Factores Climatéricos (Pre-Cosecha).-

- a) **Precipitación.-** Es el agua procedente de la atmósfera que cae en forma sólida (granizo, nieve) o líquida (lluvia, llovizna) desde las nubes y se deposita sobre la superficie de la tierra (INAMHI, 1994). Se mide en milímetros (mm) 1mm de precipitación equivalente a 1 Lt. de Lluvia / m².

La disponibilidad del agua es uno de las condiciones más importantes para la selección, implantación, crecimiento y rendimiento de los cultivos, por eso es importante conocer las regiones y épocas del año que puede asegurar un buen suministro para las plantas.

La cantidad de lluvia necesaria para el Cafeto, los límites bajos para un buen desarrollo del cafeto fluctúan entre 760-1780 mm (bien distribuidos), límites altos varía 990-3000 mm.

- b) Temperatura.-** La temperatura es la magnitud física que caracteriza el movimiento aleatorio medio de las moléculas en un cuerpo físico, en el caso de la atmósfera, el Aire.(INAMHI; 1994)
- c) Temperatura y su relación con el Cafeto.-** las Temperaturas altas inhiben el crecimiento del cafeto, porque a los 24 °C, la fotosíntesis comienza a decrecer y se hace casi imperceptible a los 34 °C (Enríquez, 1993); Sin embargo, en algunos lugares donde existen cafetales el promedio de la temperatura varía desde (7.5 °C – 25.3 °C. Y en otras varía de 20-25°C.; Rodríguez-Colaboradores, 1968)

Según (Enríquez; 1993) las temperaturas medias óptimas para el café varían de 18° a 21°C. (Fischerworrying & Robkamp; 2001); indican que la temperatura óptima oscila entre 19° a 21°C., con extremos de 17-23°C. Las temperaturas medias por encima de los 24°C, aceleran el crecimiento vegetativo, limitando la floración y el llenado de los frutos.

Las Temperaturas superiores a las óptimas para el "*Café Arábigo*", originan un rápido crecimiento, fructificación temprana, sobrecarga de las ramas jóvenes, agotamiento prematuro y marchites (Haorer; 1984). Cuando las temperatura son muy frías, el cafeto se desarrolla lento e incompleto, llegando a provocar un ennegrecimiento, distorsión y marchites de las puntas de los brotes tiernos.

VII. Características de los tipos de café.-

Existen diversas especies de género COFFEA, pero la primera cultivada fue la COFFEA ARÁBIGA que es original de Etiopía y otras regiones de África.

El principal productor actual de COFFEA es el Brasil. El 90% de café cultivado pertenece todavía a la especie COFFEA ARÁBIGA, pero en el comercio se encuentran “granos” de otras especies, principalmente *C. libérica* y *C. robusta*.

El fruto o baya del café tiene un aspecto similar a una cereza, y como ella ofrece color rojo cuando esta maduro. Cada fruta contiene 2 semillas que son los (granos de café), a partir de los cuales se separa la bebida conocida con el mismo nombre. Los bayos se las preparan para el mercado por 2 procesos distintos, uno “*HUMEDO*”, otro “*SECO*”; ambos incluyen el *Descascarillado* y la *Desección* de las semillas.

Las semillas o granos no poseen inicialmente las características aromáticas propias de la bebida acabada. Al igual que las de cacao, la adquieren durante el tostado, pero a diferencia de las de cacao, el proceso fermentativo no constituyen un factor fundamental para el desarrollo del aroma. Tras su limpieza, los granos de café se tuestan en cilindros metálicos rotatorios perforados calentados por gas. Es preciso regular cuidadosamente el suministro de aire y la temperatura.

La temperatura de tostado oscila entre unos 150° y 212 °C, y el tiempo de tostado viene a ser, por termino medio de 16-17 mm.

Las condiciones precisas para el mejor tostado varían con los diferentes lotes de grano; el tostado es más un arte que una ciencia. Los diferentes tipos de café tostado se mezclan para obtener un producto de las propiedades que se deseen, y esta mezcla se muele luego y se envasa. Para que conserve el aroma, evitando la oxidación durante el almacenamiento se puede envasar al vacío.

La **NATIONAL COFFEE ASOCIATION**, en cooperación con el **NATIONAL BUREAU OF STANDARD**, elabora finalmente el 1 de Diciembre del 1947, normas definiendo 3 tipos de molienda; **REGULAR – DRIP – FINE**, en términos de las, proporciones del producto que pasaban a través de ciertos cedazos patrón.

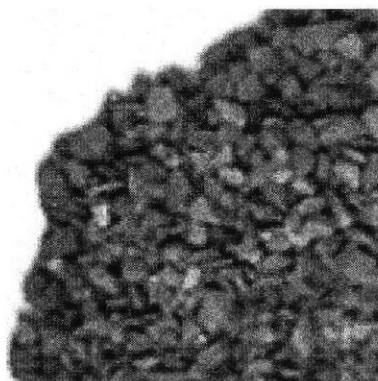
Extracto etéreo	11,08	13,75
Extracto acuoso	30,35	12,62
Cenizas	3,00	4,03
Dextrinas	0,86	-
Ac. Tánico	9,02	-

VIII. Tipos de café elaborado.

a) *Café Orgánico.*

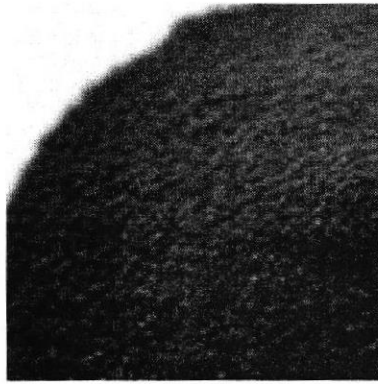
El café orgánico es un café cien por cien natural, que ha sido cultivado y luego procesado sin la presencia de sustancias químicas. Además de conservar sus características naturales, es un producto puro, libre de residuos químicos y de cualquier modificación genética.

ELCAFE goza de la certificación de NATURLAND e IMO, con lo cual se garantiza la procedencia y el proceso del café soluble. Toda la gama de productos elaborados de café (tostado y molido, polvo, aglomerado, liofilizado, saborizado, descafeinado) pueden ser ofrecidos de tipo orgánico.



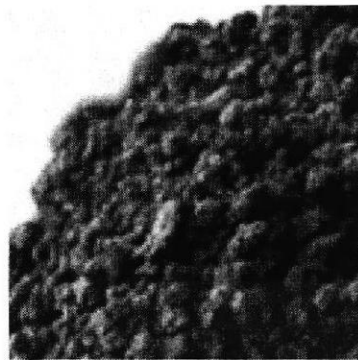
b) *Café soluble en polvo atomizado ('spray-dried').*

El café en grano recolectado, limpiado cuidadosamente, es tostado aromáticamente (desde suave hasta fuerte), triturado, extraído (con agua y alta temperatura), filtrado y centrifugado que luego se evapora para lograr la concentración ideal y se seca por atomización hasta conseguir un polvo fino soluble. Especificaciones técnica ver anexo # 4



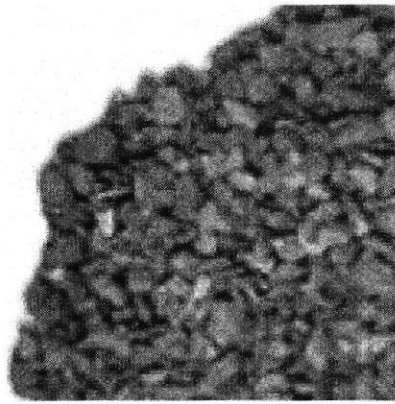
c) *Café soluble aglomerado.*

Las partículas finas de café soluble se humedecen y se secan para convertirlas en gránulos. Permite mayor concentración y mejor sabor. Especificaciones técnica ver anexo # 5



d) *Café soluble liofilizado ('freeze-dried').*

La hidrólisis (extracto de café compuesto de sólidos solubles más agua) se congela, se tritura y se clasifica las partículas por tamaño, escogiendo las de 3 milímetros, que pasan a cámaras de secado. Todo esto se realiza a temperaturas de -50°C . En las cámaras de secado, que se encuentran a bajas presiones, se extrae la humedad del extracto congelado mediante un proceso de sublimación, propiedad física mediante la cual se obtiene el paso del agua de su estado sólido a gaseoso, sin pasar por el estado líquido, quedando el producto listo para su consumo. Especificaciones técnica ver anexo # 6



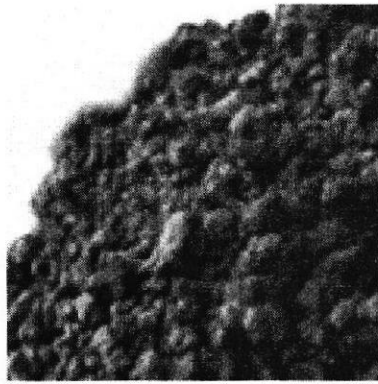
e) Café soluble aromatizado.

Un sabor singular como resultado de la combinación con hierbas o frutos: menta, nuez, eucalipto, vainilla, canela, anís, almendra, avellana, coco, chocolate, crema irlandesa y amaretto son los preferidos. Especificaciones técnica ver anexo # 7



f) Café descafeinado.

El café en grano recolectado, limpiado cuidadosamente, es tostado aromáticamente (desde suave hasta fuerte), triturado, extraído (con agua y alta temperatura), filtrado y centrifugado que luego se evapora para lograr la concentración ideal y se seca por atomización hasta conseguir un polvo fino soluble. Especificaciones técnica ver anexo # 8



g) *Café Tostado y molido.*

Granos escogidos tostados conservando aroma y molidos para reducirlo a partículas del tamaño adecuado para su preparación final. Especificaciones técnica ver anexo # 9



h) *Extracto congelado de café.*

Hidrólisis centrifugada que contiene el grado de concentración que requiere el cliente.

CAPITULO II

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC), PARA ANÁLISIS DE OCRATOXINA-A.

I. Generalidades.-

La técnica de Análisis por *Cromatografía Líquida de Alta Resolución* (HPLC; por sus siglas en ingles) están cada vez más a ser utilizados y ya están aplicados en muchos métodos oficiales. No son rápidos y son caros (*más por lo del equipo de HPLC y por las columnas de inmunoafinidad y columnas para HPLC*). Y en especial cuando hay que analizar muchas muestras y varias micotoxinas, que deben ser por separado ya que estas técnicas no permiten la multidetección.

Las condiciones mínimas detectables de micotoxinas son a veces muy bajas o en general más baja que por cromatografía en capa fina (para una misma micotoxina analizada por los dos métodos y comparando).

El sistema de cuantificación con el detector de fluorescencia, proporciona resultados más exactos y con menos variables que los obtenidos por los métodos de cuantificación por el límite de comprobación, fluorodensitometría) utilizados en la cromatografía de capa fina.

Las purificaciones que se consiguen son muy buenas ya que después, la HPLC no permite purificación deficientes; y son técnicas muy específicas para cada micotoxina en particular (*gracias a la columna de inmunoafinidad*).

El uso posterior de la cromatografía de líquidos de alta resolución y detector de fluorescencia completa la técnica de una forma muy buena.

II. Descripción de Cromatografía Líquida de Alta Resolución-HPLC. (Ver anexo # 10)

En general la cromatografía abarca todas las técnicas de separación en donde seccionan el análisis entre diferentes fases que se mueve relativamente a cada uno o donde el análisis tiene diferentes velocidades de migración. Esta última parte de la definición incluyen técnicas de cromatografías en donde lo analizado es transportado por un campo, tal como ocurre en Cromatografía electrónica.

En técnicas de cromatografía de contracorriente, ambas fases son móviles, pero en la mayoría de la técnicas de cromatografía una de las fases es estacionaria, mientras que la otra es móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido, mientras la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido inmóvil en un sólido.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución comprende todas las técnicas de cromatografía líquida que requiere el uso de presiones elevadas para forzar el líquido a través de un cámara envasado de la fase estacionaria. En base ha esto la conocemos como: Cromatografía Líquida de Alta Presión.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución es principalmente una técnica analítica de separación, empleada para detectar y análisis cuantitativos de interés en unas o varias mezclas complejas y puras. Además, también es empleado para compuestos purificados y aislados.

III. Separación mecánica empleada en Cromatografía Líquida de Alta Resolución - HPLC.

La forma tradicional de la cromatografía líquida emplea un absorbente polar, puede ser Silica o Aluminia; y una fase móvil no polar, basado en Hidrocarburos tales como Éter o Hidrocarburos clorinados como e cloroformo. Hoy en día, este tipo de

cromatógrafo es conocida como “Fase-normal”, al contrario a la cromatografía de fase reversa.

También no referimos a la parte de la Absorción de la Cromatografía, que es basada en la interacción de los grupos funcionales polares de lo que se requiere analizar con sitios polares en la superficie de las columna.

En la cromatografía de fase reversa, la fase estacionaria no-polar es utilizado en conjunto con la parte polar,.

CAPITULO III

PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA-A, APLICANDO LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC.

I. Procedimiento para la preparación del Solución Stock (Solución MADRE de OCRATOXINA-A).

Preparamos una *Solución STOCK* de 10 µl disolviendo; 5 mg del estándar seco de Ocratoxina-A pura en 500 ml de una solución, relación 99:1 (*v/v de Tolueno en Ácido Acético*).

La concentración inicial de la *Solución STOCK*, se la confirma en un espectrofotómetro UV, utilizando longitud de onda de 350 nm. para las soluciones de Di-cromato de potasio y 333 nm., para la solución de la toxina (*Ocratoxina-A*).

Se emplea luego la siguiente fórmula para obtener la absorptividad molar del Di-cromato:

$$E = (A \times 1000) / C$$

En donde; A = Absorbancia.

C = Concentración.

E = Absorptividad molar.

Se obtiene un promedio de las tres absorptividad molares y se utiliza este valor en la siguiente fórmula:

$$CF = 3160 / E$$

En donde; 3160 = Es el valor de la absorptividad molar del Di-Cromato de potasio.

CF = Factor de corrección que debe oscilar como sigue, $0,95 < CF < 1,05$. Si el valor determinado para el CF es mayor o menor a lo indicado se debe revisar la técnica o el procedimiento.

Para obtener el valor de la concentración en la *Solución STOCK de Ocratoxina-A*, se realiza la lectura de la absorbancia A de la solución con una longitud de onda de 333 nm . Y se reemplaza en la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g} / \text{g. de Ocratoxina-A} = (A \times \text{PM} \times 1000 \times \text{CF}) / E$$

En donde; PM = El peso molecular de la toxina (403)

CF = Es el factor de corrección de las soluciones de Di-cromato de potasio.

E = Es la absorptividad molar de la toxina; es decir 5440 (en tolueno-Ácido Acético, relación 99:1 (v/v)).

Obtenemos así la concentración de la *Solución STOCK de Ocratoxina-A* utilizando la siguiente formula:

$$\mu\text{g} / \text{ml. de Ocratoxina-A} = \mu\text{g} / \text{g. de Ocratoxina-A} \times \rho$$

En donde; ρ = Es la densidad de la *Solución STOCK de Ocratoxina-A* a 20°C .

II. Procedimiento para la preparación de las soluciones intermedias y soluciones de trabajo de Ocratoxina-A.

- a) A continuación se indican los pasos para prepara las soluciones intermedias, en las siguientes concentraciones: $2 \mu\text{g} / \text{ml}$; $4 \mu\text{g} / \text{ml}$; $8 \mu\text{g} / \text{ml}$; $20 \text{ ng} / \text{ml}$; $40 \text{ ng} / \text{ml}$; $80 \text{ ng} / \text{ml}$.

a.1.) Solución Intermedia, Concentración ($4 \mu\text{g} / \text{ml}$):

a.1.1.) De la fiola con la Solución Madre (Ocratoxina-A pura) con una concentración de $8,7 \mu\text{g} / \text{ml}$, debe estar a una temperatura de 20°C ., esto se lo controla mediante un termómetro de mercurio (-10°C a 350°F).

a.1.2.) Se coge una alícuota de $1,149 \text{ ml}$ de solución madre (Ocratoxina-A pura), empleando una micro jeringa de $500 \mu\text{l}$ y una de $250 \mu\text{l}$.

- a.1.3.) Verter en una matraz aforado de 5 ml.
- a.1.4.) Aforar con solución de Tolueno-Ácido acético (99:1) a 5 ml, obteniendo la solución intermedia de (**2 µg / ml**). Se emplea una pipeta de 5 ml.
- a.1.5.) Tomamos 100 µl de la solución prepara en el punto (a.1.4.) y la vertimos en un matraz volumétrico de 10 ml., empleando una micro jeringa de 100 µl.
- a.1.6.) Se lo lleva a sequedad con nitrógeno en la sorbona.
- a.1.7.) Aforamos con 10 ml de metanol (*previamente filtrado*), empleando una pipeta de 10 ml.
- a.1.8.) Tomamos 2,5 ml de la solución del punto (a.1.7.) y añadimos 2,5 ml de fase móvil, en un matraz volumétrico de 5 ml. Obteniendo la solución de trabajo de (**20 µg / ml**). Para las dos soluciones se emplea 2 micro jeringas de 500 µl.

b.1.) Solución Intermedia, Concentración (4 µg / ml):

- b.1.1.) De la fiola con la Solución Madre (Ocratoxina-A pura), debe estar a una temperatura de 20°C., esto se lo controla mediante un termómetro de mercurio (-10°C a 350°F).
- b.1.2.) Se coge una alícuota de 2,3 ml de solución madre (Ocratoxina-A pura) , empleando una micro jeringa de 500µl.
- b.1.3.) Verter en una matraz aforado de 5 ml.
- b.1.4.) Aforar con solución de Tolueno-Ácido acético (99:1) a 5 ml, obteniendo la solución intermedia de (**4 µg / ml**). Se emplea una pipeta de 5 ml.
- b.1.5.) Tomamos 100 µl de la solución prepara en el punto (b.1.4.) y la vertimos en un matraz volumétrico de 10 ml., empleando una micro jeringa de 100 µl.
- b.1.6.) Se lo lleva a sequedad con nitrógeno en la sorbona.
- b.1.7.) Aforamos con 10 ml de metanol (*previamente filtrado*), empleando una pipeta de 10 ml.

b.1.8.) Tomamos 2,5 ml de la solución del punto (b.1.7.) y añadimos 2,5 ml de fase móvil, en un matraz volumétrico de 5 ml. Obteniendo la solución de trabajo de (**40 $\mu\text{g} / \text{ml}$**). Para las dos soluciones se emplea 2 micro jeringas de 500 μl .

c.1.) Solución Intermedia, Concentración (8 $\mu\text{g} / \text{ml}$):

c.1.1.) De la fiola con la Solución Madre (Ocratoxina-A pura), debe estar a una temperatura de 20°C.

c.1.2.) Se coge una alícuota de 9,20 ml de solución madre (Ocratoxina-A pura).

c.1.3.) Verter en una matraz aforado de 10 ml.

c.1.4.) Aforar con solución de Tolueno-Ácido acético (99:1) a 10 ml, obteniendo la solución intermedia de (**4 $\mu\text{g} / \text{ml}$**).

c.1.5.) Tomamos 100 μl de la solución prepara en el punto (b.1.4.) y la vertimos en un matraz volumétrico de 10 ml.

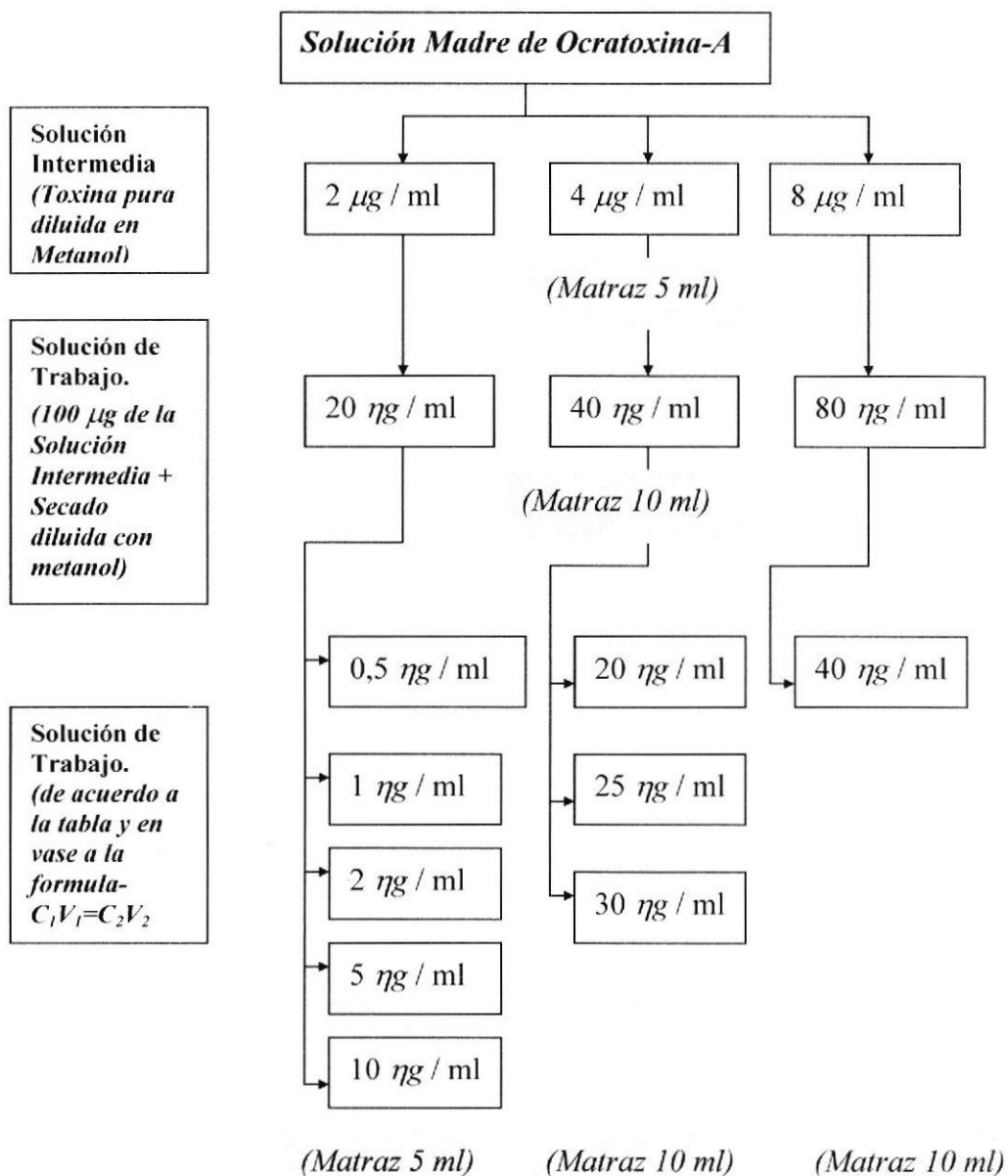
c.1.6.) Se lo lleva a sequedad con nitrógeno en la sorbona.

c.1.7.) Aforamos con 10 ml de metanol (*previamente filtrado*)

c.1.8.) Tomamos 2,5 ml de la solución del punto (b.1.7.) y añadimos 2,5 ml de fase móvil, en un matraz volumétrico de 5 ml. Obteniendo la solución de trabajo de (**80 $\mu\text{g} / \text{ml}$**).

b) A continuación se indican los procedimientos para la preparación de las soluciones de trabajo de Ocratoxina-A, en las siguientes concentraciones: 0,5 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 1 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 2 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 5 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 10 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 20 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 25 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 30 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 40 $\eta\text{g} / \text{ml}$.

Cuadro de las preparación de las soluciones a partir de la *Solución MADRE de Ocratoxina-A*:



c) A continuación se muestra los cálculos efectuados para determinar las soluciones de trabajo, aplicando la siguiente ecuación:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

En donde; C_1 = Concentración de solución 1.

V_1 = Volumen de solución 1.

C_2 = Concentración de solución 2., se desea preparar

V_2 = Volumen de solución 2, para un matraz de 5 ml.

c.1.) Solución de trabajo, Concentración (0,5 η g / ml):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \text{ (matraz de 5 ml)}$$

$$X (20 \text{ ml}) = 0,5 (5 \text{ ml})$$

$$X = \frac{(0,5) (5 \text{ ml})}{20 \text{ ml}} = 0,1250 \text{ ml de Solución Intermedia.}$$

4,8750 ml de Fase móvil. Se emplea una micro-jeringa de 500 μ l. y una de 250 μ l.

c.2) Solución de trabajo, Concentración (1 η g / ml):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \text{ (matraz de 5 ml)}$$

$$X (20 \text{ ml}) = 1 \eta\text{g} (5 \text{ ml})$$

$$X = \frac{(1 \eta\text{g}) (5 \text{ ml})}{20 \text{ ml}} = 0,2500 \text{ ml de Solución Intermedia.}$$

4,7500 ml de Fase móvil. Se emplea una micro-jeringa de 500 μ l. y una de 250 μ l.

c.3.) Solución de trabajo, Concentración (2 η g / ml):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \text{ (matraz de 5 ml)}$$

$$X (20 \text{ ml}) = 2 \eta\text{g} (5 \text{ ml})$$

$$X = \frac{(2 \eta\text{g}) (5 \text{ ml})}{20 \text{ ml}} = 0,5000 \text{ ml de Solución Intermedia.}$$

4,2500 ml de Fase móvil. Se emplea una micro-jeringa de 500 μ l. y una de 250 μ l.

c.4.) Solución de trabajo, Concentración (5 η g / ml):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \text{ (matraz de 5 ml)}$$

$$X = 5 \eta\text{g} (5 \text{ ml})$$

$$X = \frac{(5 \eta\text{g}) (5 \text{ ml})}{(20 \eta\text{g})} = 1,2500 \text{ ml de Solución Intermedia.}$$

3,7500 ml de Fase móvil. Se emplea una micro-jeringa de 500 μ l. y una de 250 μ l.

c.5.) Solución de trabajo, Concentración (10 η g / ml):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \text{ (matraz de 5 ml)}$$

$$(20 \eta\text{g}) X = 10 \eta\text{g} (5 \text{ ml})$$

$$X = \frac{(10 \eta\text{g}) (5 \text{ ml})}{(20 \eta\text{g})} = 2,5000 \text{ ml de Solución Intermedia.}$$

2,5000 ml de Fase móvil. Se emplea una micro-jeringa de 500 μ l. y una de 250 μ l.

c.6.) Solución de trabajo, Concentración (20 η g / ml):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \text{ (matraz de 10 ml)}$$

$$(40 \eta\text{g}) X = 20 \eta\text{g} (10 \text{ ml})$$

$$X = \frac{(20 \eta\text{g}) (10 \text{ ml})}{(40 \eta\text{g})} = 5,0000 \text{ ml de Solución Intermedia.}$$

5,0000 ml de Fase móvil. Se emplea una micro-jeringa de 500 μ l.

c.7.) Solución de trabajo, Concentración (25 η g / ml):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \text{ (matraz de 10 ml)}$$

$$(40 \eta\text{g}) X = 25 \eta\text{g} (10 \text{ ml})$$

$$X = \frac{(25 \eta\text{g}) (10 \text{ ml})}{(40 \eta\text{g})} = 6,2500 \text{ ml de Solución Intermedia.}$$

3,7500 ml de Fase móvil. Se emplea una micro-jeringa de 500 μ l. y una de 250 μ l.

c.8.) Solución de trabajo, Concentración (30 η g / ml):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \text{ (matraz de 10 ml)}$$

$$(40 \eta\text{g}) X = 30 \eta\text{g} (10 \text{ ml})$$

$$X = \frac{(30 \eta\text{g}) (10 \text{ ml})}{(40 \eta\text{g})} = 7,5000 \text{ ml de Solución Intermedia.}$$

2,5000 ml de Fase móvil. Se emplea una micro-jeringa de 500 μ l.

c.9.) Solución de trabajo, Concentración (40 η g / ml):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \text{ (matraz de 10 ml)}$$



$$(80 \text{ } \eta\text{g}) X = 40 \text{ } \eta\text{g} (10 \text{ ml})$$

$$X = \frac{(40 \text{ } \eta\text{g})(10 \text{ ml})}{(80 \text{ } \eta\text{g})} = 5,0000 \text{ ml de Solución Intermedia.}$$

5,0000 ml de Fase móvil. Se emplea una micro-jeringa de 500 μl .

III. Procedimiento para la elaboración de la Curva de Calibración (Áreas de integración de los Estándares de Ocratoxina-A).-

- a) Una vez elaboradas las soluciones de trabajo con las diferentes concentraciones, se prosigue a inyectar (5 veces) la cantidad de 75 μl a una temperatura ambiente (25°C), empleando una micro-jeringa de 150 μl .
- b) El cromatógrafo previamente calibrado automáticamente, y en el integrador que se encuentra digitalizado los parámetros para determinar la curva de Calibración de Ocratoxina-A.
- c) Se inyecta los 75 μl en el inyector del cromatógrafo y se espera que este analice la muestra en un lapso de 17 min., esto se lo realiza 5 veces para poder obtener una media de cada concentración de la solución de trabajo (0,5 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 1 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 2 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 5 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 10 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 20 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 25 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 30 $\eta\text{g} / \text{ml}$; 40 $\eta\text{g} / \text{ml}$).
- d) Una ves obtenido los valores del área bajo la curva que se grafica en el integrador a un tiempo determinado de 12 o 13 min., se marca esa área y se la rotula con la concentración de la solución de trabajo analizada.
- e) Estos 5 resultados se los ingresa en una hoja de calculo-Excel, para elaborar la Curva de Calibración (*Unidades de área "mV/s" vs. Concentraciones " $\mu\text{g}/\text{ml}$ "*).
- f) En el caso de que un punto de la media de las concentraciones se grafique desviado con referencia a los otros puntos de la media, se procederá a volver a preparar esa concentración desde el inicio, inyectarlo en el cromatógrafo y

obtener el resultado, para poder ingresar los valores de la media en la hoja de cálculo. (Ver anexo # 11)

- g) Cuando los punto (valor medio de las concentraciones) formen una recta, se procede a analizar las muestras de café verde. El tiempo que sirve las soluciones de trabajo es de 1 mes, por lo que cada mes se debe realizar una nueva curva y nuevas soluciones de trabajo.

IV. Procedimientos para la preparación de las soluciones requeridas para el análisis de Ocratoxina-A; empleando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución-HPLC.

a) **Solvente de Extracción.-**

Es una mezcla de una relación de 50:50, entre metanol (*previamente filtrado al vacío*), en una solución al 3% de Bicarbonato de sodio, el solvente es envasado en un frasco de vidrio de color ámbar de 1000 cc.

b) **Solución al 3% de Bicarbonato de sodio.-**

Se pesa 30,0000 g. De bicarbonato de sodio, empleando una balanza analítica (margen de error +/- 0,0001 g.) y con ayuda de un beaker de 50 ml. A continuación se lo traspasa a un matraz aforado (*esmerilado*) de 1000 cc., y se lo lleva al ras con agua calidad HPLC; se lo coloca en la plancha calefactora-agitadora y con la ayuda de un agitador magnético se lo deja hasta obtener una solución homogénea, finalmente se realiza un filtrado al vacío (*empleando el equipo de vacío*) y envasado en un frasco de vidrio de color ámbar de 1000 cc.

c) **Solución de Solución Buffer Fosfato-PBS.-**

Se la realiza en una balanza analítica (*margen de error +/- 0,0001 g*).

	Cantidad
Cloruro de sodio	8,0000 g.
Fosfato de sodio di-básico anhídrido	1,1600 g.
Fosfato de potasio mono-básico	0,2000 g.
Cloruro de potasio	0,2000 g.

Agua calidad HPLC	1000 cc
-------------------	---------

Se la mezcla en un matraz aforado-esmerilado de 1000cc., al ras; mediante un agitador magnético en una plancha calefactora-agitadora se homogeniza la solución, luego se realiza un filtrado al vacío empleando el equipo de vacío y finalmente envasado en un frasco de vidrio de color ámbar de 1000 cc.

d) Fase móvil.-

La fase móvil consta de una solución filtrada de 45%, en una relación (v/v) de Acetonitrilo y 55% de 4M de Acetato de sodio en Ácido Acético, relación de 19:1 (v/v).

e) Solución de Di-cromato de potasio.-

La solución de Di-Cromato de potasio se prepara disolviendo 78 mg del Di-cromato en una solución de Ácido sulfúrico (1 ml diluido en, 1 lt. de agua calidad HPLC). Los 78 mg. se los disuelve en 0,25 M del Di-cromato. Luego, se toma una alícuota de esta solución y se la disuelve en la misma cantidad de volumen de esta solución ácida hasta alcanzar una concentración de 0,0625 mM. Se mide la absorbancia A de estas 3 soluciones de Di-cromato de potasio contra el blanco a una longitud de onda de 350 ηm .

V. Procedimientos para la preparación de la muestra de café verde para la determinación de Ocratoxina-A.

a) Pesado de la muestra:

- a.1 La muestra es una cantidad de 200 gr. envasada en una funda plástica, rotulada con la fecha de ingreso y a que tipo de proceso es dirigido mediante un código.
- a.2 Mediante una cuchara previamente lavada, sanitizada y esterilizada, se toma 25,0000 g. De café verde (*previamente molido*). En una balanza analítica de 0,0000, con error de +/- 0,0001 g., se pesa con en un beaker de 50 ml. (*se cubre con papel aluminio para evitar que capte humedad*).

- b) Lo llevados a un beaker (1.000ml), y lo diluimos en 200 ml de Solvente de Extracción, mediante una pipeta volumétrica de 100 ml.
- c) Se cubre el beaker con papel aluminio, se procede a agitar la mezcla durante 15 min., en una plancha calefactora-agitadora a velocidad media con ayuda de un agitador magnético.
- d) Luego pasas por una etapa de filtrado al vacío, con la ayuda de un equipo de vacío, llamado "*Porta filtro*" (bomba de vacío; Embudo de 300 ml esmerilado; Base y cubierta con tubo lateral para vacío de vidrio; pinzas de sujeción de aluminio; matraz kitasato de boca esmerilada de 1000 cc., Base de vidrio con rejilla de acero inoxidable, y junta de Fosfato de Etilo de politolueno-PTFE .Y un filtro de micro fibra de 1µm de diámetro.
- e) Mediante una pipeta de (5 ml), tomar una alícuota de 4 ml de la solución filtrada.
- f) Diluir la solución filtrada en un matraz aforada de 100 ml, hasta completar los 100 ml con solución de PBS, con la ayuda de una pipeta volumétrica de 100 ml.
- g) Se agita la dilución, luego se la pasa por una columna de inmunoafinidad (Ochratest para VICAM), empleando un acuba (marca Milliphoy) que posee llaves de paso. *(en el caso que la solución diluida no fluya, se ejerce una pequeña presión de vacío, máx.-5psi, para que el goteo se normalice)*. Luego se lava la columna con 10 ml de agua calidad-HPLC, con la ayuda de una pipeta de 10 ml.
- h) Terminado el lavado con agua calidad-HPLC, se conecta una aguja a la columna de inmunoafinidad (Ochratest para VICAM), luego es sujetado a una base con un mecanismo de bombeo manual para proceder a eluir la *Ocratoxina-A* del gel de la columna Ochratest, empleando 4 ml de metanol (previamente filtrado, empleando una unidad de filtrado-Millex) y con la ayuda de una pipeta de 5 ml. La aguja es insertado en tubo de centrifugación donde va a quedar la *Ocratoxina*

-A concentrada; para que gotee se ejerce una pequeña presión inicial sobre el columna y mediante la gravedad se espera que gotee los 4 ml, finalmente con el mismo mecanismo de bombeo manual se efectúa la succión de Ocratoxina-A, eluida y se lo vuelve a pasar mediante goteo, esto se lo realiza 3 veces (Retro-lavado).

- i) Empleando un equipo de secado (Sorbona, Baño maría con rejilla y un Tanque de Nitrógeno con conexión-manguera y una terminal de acero inoxidable en forma de ganchitos individuales (Cantidad 6)), el tubo de centrifugación con la Ocratoxina-A eluida es colocado en la rejilla del baño maría a 40°C., luego se inserta uno de los ganchitos en el tubo, se enciende la sorbona y se abre la llave de paso del nitrógeno, regulando la presión no mayor a 5. El tiempo de secado va a variar de 30 a 40 min., concluye cuando en las paredes no se divisa gotitas sobre las paredes. Si se excede del tiempo, las partículas de Ocratoxina-A secas se volatilizan rápidamente perdiendo un buen porcentaje de contenido real.
- j) Mediante una micro-pipeta de 500 μl (*previamente lavada con metanol y secada*), diluimos el residuo secado en 150 μl de *Fase móvil*. Luego es llevado a una centrifuga por 1 min. para homogenizar la muestra y poder remover partículas adheridas a las paredes internas del tubo.
- k) Mediante el empleo de una micro-jeringa de (200 μl), se procede a inyectar 75 μl de la muestra en el inyector del cromatógrafo.

Para analizar una muestra de *Ocratoxina-A* en grano de café verde, este tiene que ser comparada frente a una muestra patrón de varias concentraciones de Ocratoxina-A, llamadas "*Solución de trabajo*"

- l) Una vez que el cromatógrafo se encuentra calibrado y regulada la presión de trabajo, se procede a inyectar para análisis de muestra de grano de café verde en el siguiente orden: Solución de trabajo, cualquiera que sea la concentración y luego la muestra de café, esto se lo realiza para todas las muestra ha analizar.

En el caso de que se requiera conocer el “*Porcentaje de recuperación de Ocratoxina-A en café verde*”, se procede a inyectar primera la *solución de trabajo* y luego muestra de grano de café verde agregada la toxina, luego se inyecta la *Solución de trabajo* (a la misma concentración) y posterior se inyecta la muestra de grano de café verde sin toxina agregada.

m) Se espera para que el cromatógrafo determine las concentración de Ocratoxina-A, en tiempo real y paralelamente integre los datos de la curva obteniendo los resultados de la concentraciones en un lapso de 17 min. por muestra inyectada.

Nota: En el caso que los resultados de las soluciones de trabajo no se encuentren en los rangos establecido en la gráfica de la curva patrón, se deberá seguir inyectando la solución de trabajo hasta obtener los datos correctos, esto se podrá realizar hasta un máximo de error de datos de 3 veces. Si excede se procederá a utilizar una solución de trabajo con otra concentración.

n) Una vez obtenido los resultados de las concentraciones se procede a tabular frente a los datos de la curva patrón, obteniendo las concentraciones reales de Ocratoxina-A en la muestra analizada.

VI. Preparación del Equipo HPLC-Cromatógrafo e Impresora.

b) Se realiza un Pre-enjuague de la columna del Cromatógrafo de la siguiente manera.

a.1 Se observa y verifica que la fiola esmerilada de 1000 ml tenga la suficiente cantidad (700-850 ml) de metanol, y el tiempo de preparación; si ha pasado de 24 horas se debe filtrar el metanol. Se enciende la bomba del cromatógrafo y mediante un controlador de flujo, se regula el flujo hasta 1.0 ml/min, o en todo caso que la presión de operación que ejerce el líquido a una velocidad no pase de 2.5 Mpa. El tiempo de exposición con el metanol es de un lapso de 45 min. a 1 hora. (Dependiendo de la cantidad de muestra que haya analizado o si se realizo la curva Standart)

- b.1 Terminado el enjuague con metanol, se reduce la velocidad del flujo hasta 0 ml/min. y se espera que disminuya la presión operacional hasta 0 Mpa., se apaga la bomba y se seca el filtro mediante un papel (tipo tisú) de VICAM. Se cambia la fiola de metanol por una fiola de Agua-HPLC., se enciende la bomba y se va aumentando el flujo del agua sin pasar de 1 ml / min., la velocidad o que no pase de 2.5 Mpa., por un lapso de 1 hora.
- c.1 Al finalizar el Pre-enjuague con agua, se disminuye la velocidad del flujo a 0.0 ml/ min., se espera que la presión descienda a 0 Mpa. Se apaga la bomba. Se seca el filtro, y se realiza el cambio de fiola de agua con una fiola de metanol (recién filtrado) y se realiza el mismo procedimiento de los dos casos anteriores. El lapso de exposición con metanol es de 30 min.
- d.1 Al terminar el lapso establecido. Se procede a secar el filtro y efectuar el cambio de la fiola con metanol por una fiola con Fase móvil y tapado con un pedazo de papel aluminio
- e.1 La preparación de la fase móvil se la puede encontrar el Tópico de preparación de soluciones para la Técnica de HPLC.
- f.1 Se enciende la bomba, modelo (Waters 510 HPLC-Pump/ con válvulas de referencia óptica), se espera que se regule la presión de operación a 2.5 Mpa; luego el cromatógrafo, modelo (Waters 2475 Multiλ Detector de Fluorescencia), se espera hasta que el equipo se calibre automáticamente, que es hasta que se visualiza en la pantalla las coordenadas de la curva. Y Seguido se enciende el Integrador de datos. Una vez encendido el integrador esta listo para digitar los parámetros que va a graficar la curva de detección de Ocratoxina-A. Esto valores van a depender del tipo de Análisis que vallas a trabajar, siendo para

determinar la “Curva Standart de Ocratoxina-A en varias concentraciones”, y “Curva para analizar Muestra vs. Standart”.

c) A continuación se digitaliza los parámetros necesarios para la detección de Ocratoxina-A, “OTA-VERDE” en grano de café verde:

- b.1 Boton “Dialogo”.
- c.1 Digitar botón “Y” (yes)
- d.1 Digitar botón “N” (no).
- e.1 Realizar un “Enter”.
- f.1 Digitar “OTA-VERDE”.
- g.1 Digitar el siguiente cuadro:

Π	TF	TV
0,1	AZ	1
0,2	AT	16
0,3	Cs	0,5
0,4	Ft	1
12	Er	1

Hasta el punto g.1 son para realizar la “Curva Estándar de OCRATOXINA-A”

- h.1 TT = realizar un “Enter”
- i.1 5
- j.1 # Nevelo = digitar “1”
- k.1 Enjection = digitar “1”
- l.1 Digitar el siguiente cuadro:

Este valor varía de acuerdo a la Concentración del Standart o Solución de Trabajo

TIME	RT = “11,50”	CC = 2	CN = “OCRATOXINA-A”
------	--------------	--------	---------------------

- m.1 RT = realizar un “Enter”
- n.1 Realizar un “Doble Enter”
- o.1 Nombre = Digitar el nombre de la persona encargada
- p.1 RA = Digitar “1”
- q.1 CI = Digitar “1”
- r.1 Concentración Unitaria = Digitar “ng /ml”
- s.1

SI= Digitar “1”	SN= Digitar “MUESTRA”	SA= Digitar “1”	XF= Realizar “Enter”
-----------------	-----------------------	-----------------	----------------------

- t.1 SI = Realizar un "Enter"
- u.1 END = Digitar botón "LCD /STATUS"

CAPITULO IV

OCRATOXINA-A

I. Descripción.-

Es otra micotoxina clasificada como: Nefrotóxica, producida por el *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium Variable*, *P. Politans* entre otras especies del género *Aspergillus* y *Penicillium*. Sin embargo, el principal productor es el *A. ochraceus*; ampliamente distribuido en la naturaleza siendo sus alimentos que son preferidos por el *microhongo* en el Trigo, sorgo, Arroz, Maíz, maní, Hortalizas e incluso se han llegado a determinar en estos alimentos concentraciones de hasta 27 ppm. En nuestro país, otros de los alimentos afectados es el Café.

Las Ocratoxinas son derivados químicamente de anillos cíclicos de D-hidrometil isocumarinas, muy solubles en solventes orgánicos.

II. Clasificación.-

Existen 3 tipos de Ocratoxinas:

Tipo A: Contiene *Cloro* en el anillo isocumarina.

Tipo B: No contiene *Cloro*.

Tipo C: Contiene *Cloro* y un *éter de etilo*.

La más potente es la de tipo A.

III. Dosis Letal Media.-

En pruebas de laboratorio son tóxicas para los bovinos, porcinos y ratas, en las siguientes concentraciones de Dosis Letal medio.

DL 50 (rata) = 20 – 25 ppm.

DL 50 (cerdos) = 200 ppb.

Tabla 5. Principales micotoxinas y su relación con evidencias de carcinogenicidad.

Micotoxina	Evidencia de Carcinogenicidad		Clasificación IARC
	Humana	Animal	
Aflatoxinas	S	S	1
Aflatoxina M ₁	I	S	2B
Esterigmatocistina	ND	S	2B
Griseofulvina	ND	S	2B
Ocratoxina A	I	S	2B
Fumonisinias	I	S	2B
Ac. Penicilico	ND	L	3
Citrinina	ND	L	3
Patulina	ND	I	3
Toxina T-2	ND	L	3
Toxinas de <i>F. graminearum</i> (zearalenona y triotecenos)	I	L	3

S: evidencia suficiente; I: evidencia insuficiente; ND: no datos; L: evidencia limitada

Tabla 6. Reglamentaciones existentes sobre las principales micotoxinas a nivel mundial.

Micotoxinas	Nivel límite (µg/kg)	Tipo de alimentos	Países
Aflatoxinas			
B1, B2, G1, G2	0-50	Alimentos consumo humano	7 ^a
	5-1.000	Alimentos consumo animal	
M1	0-1	Leche y derivados	17
Chetomina	0	Piensos	Rumania
DON	5-10.000	Trigo y piensos	5 ^a
Fumonisinias	1.000	Maiz	Suiza ^a
Ocratoxina A	1-300	Cereales, café, piensos alimentos y riñones	11 ^a
Patulina	20-50	Zumo manzana y der. manzana	12 ^a
Phomopsina	5	Todos	Australia
Stachybotriotoxina	0	Piensos	Rumania
Toxina HT-2	25-100	Piensos	Canada
Toxina T-2	100	Cereales y harinas	Rusia e Israel
Zearalenona	30-1.000	Alimentos (nueces, cereales y legumin)	6 ^a

a: Austria, Canada, Rumania, Rusia y USA.

b: Reglamentación provisional.

c: Austria, Brasil, Chequia, Dinamarca, Francia, Grecia, Israel, Rumania, Suecia, Suiza y Uruguay.

d: Austria, Chequia, Finlandia, Francia, Grecia, Israel, Noruega, Rumania, Rusia, Suecia, Suiza y Uruguay.

e: Austria, Brasil, Francia, Rumania, Rusia y Uruguay.

IV. Condiciones de almacenamiento de la Ocratoxina

La producción de la toxina se encuentra influenciada por la humedad y la Temperatura ambiental y al parecer las condiciones más idóneas son 39% de humedad a 30 °C.

Se agrava el problema en producción de micotoxinas cuando el almacenamiento de materias primas siguen procedimientos primitivos, sobre todo cuando las temperaturas de almacenamiento son de 35°C y 37°C.

V. Método invasivo de la Ocratoxina-A.-

Los hongos pueden hacer daños al hombre a través de 2 vías:

- Colonización de las formas vegetativas sobre la epidermis.
- Producción de proteínas y de forma tóxicas denominadas micotoxinas.

Las toxinas de los hongos tienen una naturaleza en la que la fracción lipídica supera a la fracción soluble. Las toxinas de los hongos pueden estar contenidas en las esporas y sus miscelas o bien ser excretadas como *exotoxinas*.

La vía de entrada en el organismo de una toxina generalmente es digestiva aunque puede existir otras vías. La absorción de una cierta cantidad de toxina por el organismo causa generalmente una reacción en el tubo digestivos tratando los eritrocitos de ingresar a la célula una sustancia no reconocida enzimáticamente, el tejido puede verse dañado y en muchas ocasiones puede hacer hemorragias y necrosis de los tejidos.

Además ha observado que muchos de estas toxinas poseen una alta especificidad por un órgano o un tejido, siendo los más frecuentemente atacados el *Higado*, *Riñones* y el *Sistema nervioso*.

Los mohos productores de micotoxinas pueden hacerlo en 2 momentos: Habitando como *Parásitos* en las plantas, o bien *contaminando* los alimentos cosechados, almacenados, o procesados a favor de la humedad, temperatura, defectuosa aireación, pH u otras condiciones idóneas para el desarrollo y crecimiento del moho durante la cual la toxina es formada.

La determinación de micotoxinas de manera general comprende procesos de extracción, purificación, identificación y dosificación. La extracción se realiza con

solventes polares, del tipo cloroformo, metanol, acetona o acetato de etilo, con adición: uno de agua, según las características de la micotoxinas.

Benceno +/- polar 3; Etanol +/- polar 5; Agua +/- polar 1

La purificación generalmente es conseguida a través de procedimientos cromatográficos.



CONCLUSIONES

La técnica Cromatografía Líquida de Alta Resolución-HPLC, es muy eficaz para la determinación de cuantitativa de Ocratoxina-A en concentraciones de parte por billón “ppb”. Ya que el equipos permite gracias a su amplio espectro de onda y su columna, así como los parámetros establecidos para obtener resultados con márgenes de errores mínimos.

El control de la materia prima mediante la aplicación de esta técnica permite aceptar o rechazar el pedido, con un respaldo garantizado mediante la técnica.

El manejo del cromatógrafo para su obtimización debe ser manejado por personal conocedor del tema, o que este se adiestrado de acuerdo a como lo requiere la técnica, debido a que es un equipo muy sensible a fallas de sistema.

RECOMENDACIONES

El equipo requiere de una limpieza constante, y su calibración periódica para evitar fallas en el proceso de análisis. Y es necesario seguir los pasos tal como indica los manuales para obtener resultados correctos.

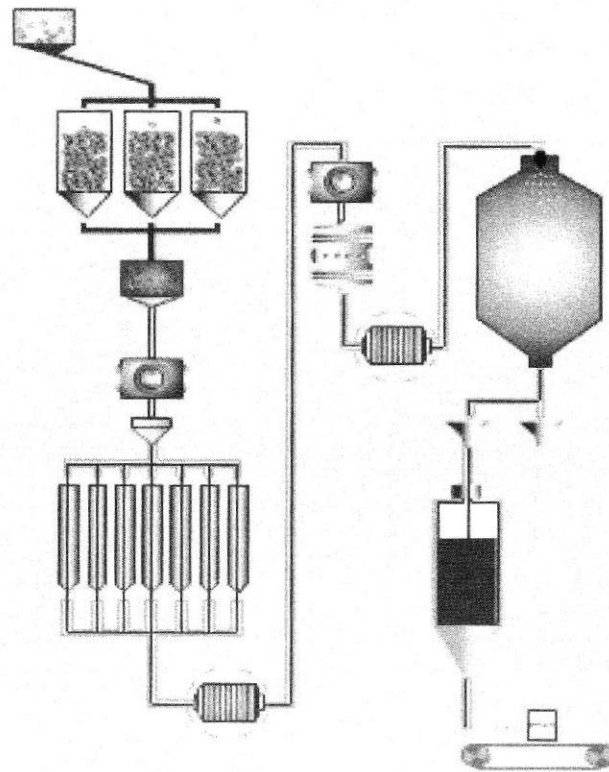
El personal que labore con ese equipo, tendrá que ser adiestrado adecuadamente por un experto, ya que si se comete alguna falla, el equipo presentará cotidianas fallas durante su utilización.

BIBLIOGRAFÍA

- Lisker N, Lillehoj EB. Prevention of mycotoxin contamination at the preharvest stage. En: Smith JE, Henderson RS (Eds.). Boca Raton, CRC Press, 1991: 689-719.
- Jay James M. MICROBIOLOGÍA MODERNA DE LOS ALIMENTOS; Editorial ACRIBIA; 2da Edición. Zaragoza-España.
- <http://www.millipore.com/manual/sampleprep>.
- CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y ORGANOLÉPTICA DE CAFÉS ARÁBIGA EN LOS PRINCIPALES AGRO ECOSISTEMAS DEL ECUADOR; Grupo Noboa.

Anexo # 1

Proceso de Café Spray Dried-Café seco en polvo



Procesos de Elaboración del café

Café Spray Dried

El producto es recogido y empaquetado como el Café Spray Dried

Café Spray Dried

Café Aglomerado

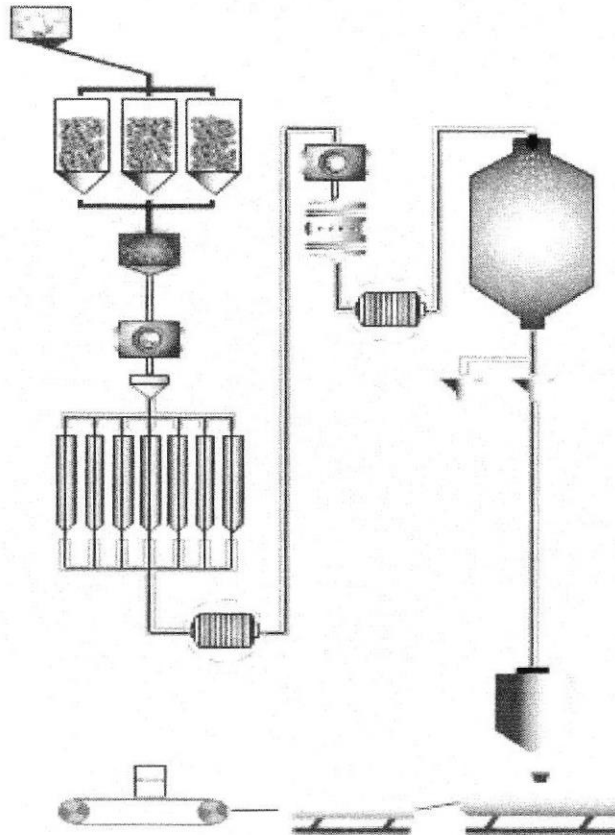
Café Liofilizado

Presione para continuar



Anexo # 2

Proceso del Café Aglomerado.



Procesos de Elaboración del café

Café Aglomerado.

3. Empacado

Finalmente el Café Aglomerado es recogido y empacado.

Café Spray Dried

Café Aglomerado

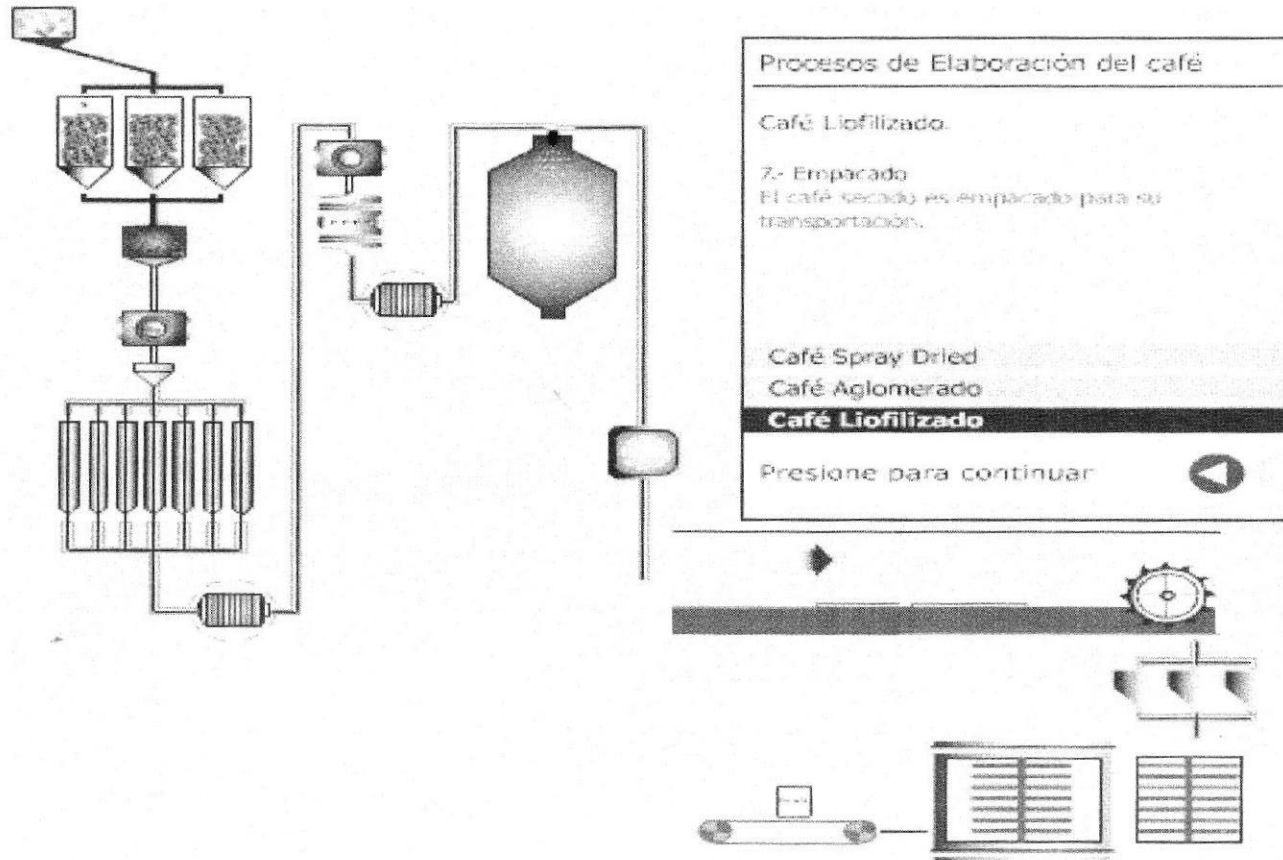
Café Liofilizado

Presione para continuar



Anexo # 3

Proceso del Café Liofilizado



Procesos de Elaboración del café

Café Liofilizado.

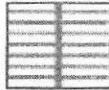
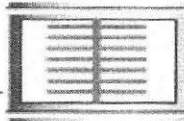
7- Empacado
El café secado es empacado para su
transportación.

Café Spray Dried

Café Aglomerado

Café Liofilizado

Presione para continuar



Anexo # 4

Café soluble en polvo atomizado ('spray-dried') y Café Orgánico

Parámetros		Malla #	mm.	Min-Max
Humedad máx. (%) Método de estufa	3.0	5	4.00	
Densidad libre g/l [*]	160 - 260	6	3.95	
Densidad vibrada g/l [*]	200 - 350	7	2.90	
Color [*] Método Photovolt	45 - 90	8	2.96	
PH	4.70 - 5.20	10	2.00	
Acidez	4.50 - 6.95	14	1.40	
Cafeína min. (%)	2.8	18	1.00	0 - 2
Fluides ml.	38 - 52	25	0.71	0 - 5
		35	0.50	3 - 15
		40	0.425	
		60	0.25	30 - 60
		120	0.125	20 - 40
		Fondo		10 - 20

^{*} Parámetros que pueden ajustarse a solicitud del cliente, según sus requerimientos.

Anexo # 5

Café soluble aglomerado

Parámetros de Calidad

Parámetros	
Humedad máx. (%) Método de estufa	3.0
Densidad libre g/l [*]	160 - 220
Densidad vibrada g/l [*]	210 - 260
Color *Método Photovolt	26 - 45
PH	4.70 - 5.20
Acidez	4.50 - 6.85
Cafeína min. (%)	2.5
Fluidoz ml.	

^{*} Parámetros que pueden ajustarse a solicitud del cliente, según sus requerimientos.

Parámetros de Malla

Malla #	mm.	Min-Max
5	4.00	0 - 2
6	3.35	
7	2.80	20 - 50
8	2.36	
10	2.00	20 - 40
14	1.40	5 - 30
18	1.00	5 - 20
25	0.71	5 - 15
35	0.50	1 - 10
40	0.425	
60	0.25	3 - 10
100	0.125	
Fondo		10 - 15



Anexo # 6

Café soluble liofilizado (freeze-dried)

Parámetros		Malla #	mm.	Soluble liofilizado
Humedad máx. (%) Método de estufa	3.0	5	4.00	
Densidad libre g/l [^]	190 - 230	6	3.35	
Densidad vibrada g/l [^]	215 - 275	7	2.80	
Color [^] Método Photovolt	60 - 90	8	2.36	1 - 10
PH	4.70 - 5.20	10	2.00	30 - 50
Acidez	4.50 - 6.85	14	1.40	20 - 40
Cafeína mín. (%)	2.8	18	1.00	10 - 20
Fluidéz ml.		25	0.71	1 - 10
[^] Parámetros que pueden ajustarse a solicitud del cliente, según sus requerimientos.		35	0.50	
		40	0.425	1 - 10
		60	0.25	1 - 5
		120	0.125	
		Fondo		1 - 5

Anexo # 7

Café Tostado y molido

Propiedades físicas y químicas

Parámetros	
Humedad rápida %	1-2
Contenido de cafeína robusta máx.	2.4
Contenido de cafeína arábica máx.	1.3

Constitución y distribución granulométrica

Malla #	mm.	Min-Max
20	0.850	5-10
60	3.35	40-60
80	2.80	20-30
100	2.36	5-10
Fondo		10-15

Anexo # 8

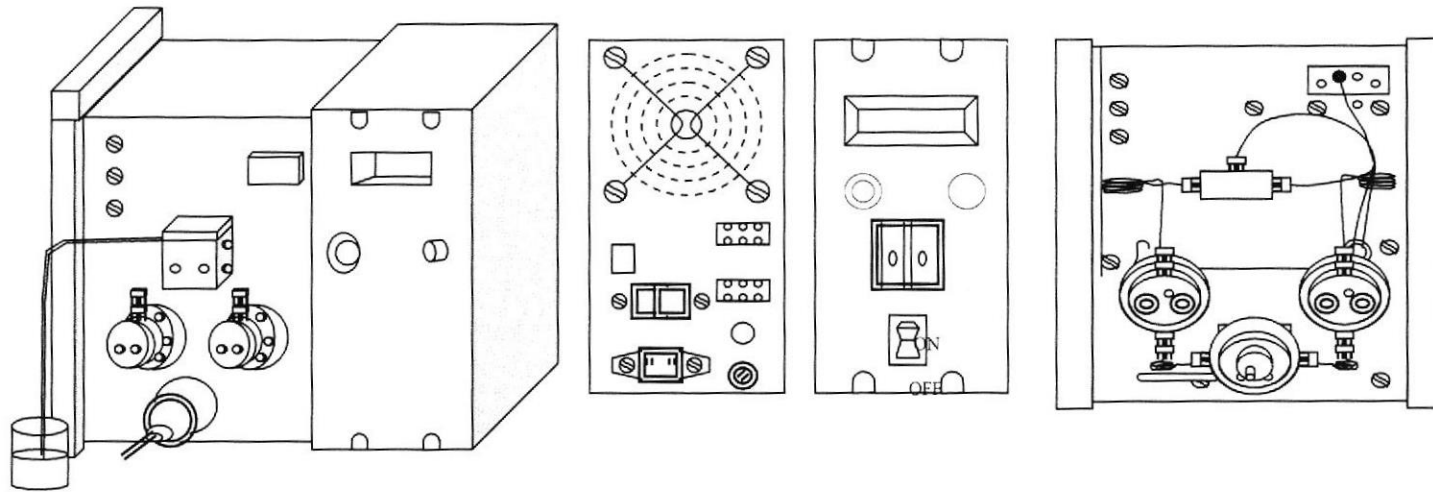
Café soluble aromatizado

Parámetros		Malla #	mm.	Min-Max
Humedad máx. (%) Método de estufa	3.0	5	4.00	
Densidad libre g/l ^a	160 - 260	6	3.35	
Densidad vibrada g/l ^a	200 - 350	7	2.90	
Color *Método Photovolt	45 - 90	8	2.36	
		10	2.00	
		14	1.40	
		18	1.00	0 - 2
		25	0.71	0 - 5
		35	0.50	3 - 15
		40	0.425	
		60	0.25	30 - 60
		120	0.125	20 - 40
		Fondo		10 - 20

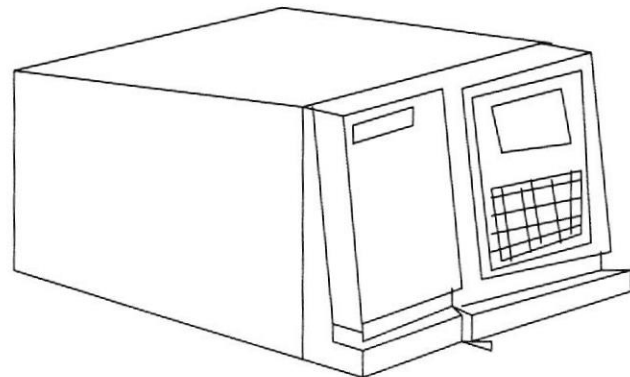
* Parámetros que pueden ajustarse a solicitud del cliente, según sus requerimientos.

Anexo # 10

BOMBA WATER 510 HPLC
(con valvulas referencias ópticas)



DETECTOR DE FLUORECENCIA
WATERS 2475 Multi



Anexo # 11



Cis de Elaborados de Café C.A.

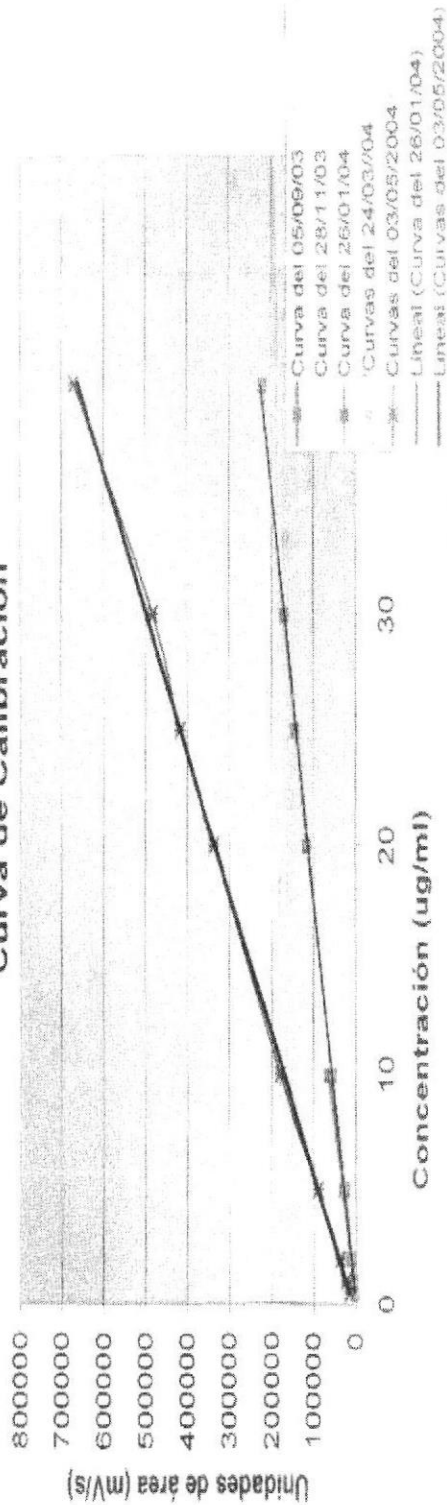


Grupo Noboa

Departamento de Control de Calidad
Laboratorio de Cromatografía
Investigación y Desarrollo, Guayaquil

Áreas de Integración de los Estándares de Ocratoxina-A

Curva de Calibración



Fecha de Calibración
05/09/2003
28/11/2003
26/01/2004
24/03/2004
03/05/2004

0.5	1	2	5	10	20	25	30	40
2637	5696	11968	29654	64484	117646	144860	170326	219383
3426	5169	10727	29243	55765	117646	144860	170326	219383
4054	4984	10245	24566	5015	116350	144836	170733	221778
3071	5121	10356	27519	54973	114896	144597	166956	223750
18308	24769	37055	89176	181096	335756	417908	482259	670502

Promedio
Desviación Estándar
% Desviación Estándar

5699	9148	16070	40032	82267	171162	213050	247569	333853
568	373	878	291	6165	109735	136572	156469	224440
10	4	5	1	7	64	64	63	67