

Efecto de la aplicación de cuatro ácidos orgánicos y de un detergente neutro sobre la carga microbiana total y *Escherichia coli* en broza del café costarricense

Fecha de recepción: 06/04/2010

Fecha de aceptación: 14/06/2010

Pedro Vargas Aguilar¹

Esteban González Chavarría²

Palabras clave

Broza del café, desinfección de broza, ácidos orgánicos desinfectantes.

Resumen

Dada la importancia de la actividad cafetalera en Costa Rica, existe un gran número de beneficios de café que generan un considerable volumen de residuos contaminantes, como lo son las aguas de desecho, las mieles y la pulpa o broza. En la mayoría de los casos, dichos subproductos son vertidos directamente a los ríos y las tierras superficiales, lo que provoca una gran contaminación, especialmente en las épocas de cosecha. En el beneficio de café, la broza se trata como un desecho, por lo que contamina fuertemente, ya que el interés principal de esta industria no es la broza, sino el grano. Sin embargo,

en numerosos estudios se ha demostrado que la broza del café es una fuente de polifenoles que podrían ser aprovechados, de alguna manera en la industria; por lo tanto, la presente investigación evalúa la calidad microbiológica de la broza del café proveniente de un beneficio del Valle Central y el efecto de varios ácidos orgánicos y de un detergente neutro sobre su carga microbiana, para evaluar la posibilidad de que este subproducto tenga un uso alternativo como materia prima para futuros productos alimenticios con valores nutracéuticos.

El estudio dio como resultado que solamente dos de los ácidos utilizados disminuyen significativamente la carga microbiana inicial de la broza, pero que, aun así, dicha disminución no cumplió con los niveles establecidos para un producto alimenticio por el Reglamento Técnico

1. Escuela de Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Teléfonos: 2511-3469, 2511-8851. Fax: 2511-4710. Correo electrónico: pedro.vargas@ucr.ac.cr
2. Estudiante Maestría en Ciencias de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Teléfono: 2511-3470. Correo electrónico: estebang10@gmail.com

A escala mundial se enfrenta un reto en el tema de la seguridad alimentaria, lo cual obliga a la modernización de nuestros sistemas de producción, no solo con el fin de asegurar los alimentos para el futuro, sino también al desarrollo de productos novedosos y el aprovechamiento de materias primas poco utilizadas, como lo es, en nuestro caso, la broza del café.

Centroamericano (2009), (límite máximo 10^3 UFC para la carga microbiana total como recuento total aerobio y < 3 NMP/g para *Escherichia coli*). Por lo anterior, se deberán realizar estudios adicionales, utilizando otros tipos de desinfectantes y aumentado la concentración de los ya estudiados, sobre todo cambiando las prácticas del manejo del grano que se da en estos lugares, a fin de obtener una broza menos contaminada.

Key words

Coffee pulp, coffee pulp disinfection, organic acids disinfectants.

Abstract

Given the importance of the coffee industry in Costa Rica, there are a large number of coffee processing plants that produce large amounts of pollutants sub products such as water, molasses and pulp. In most of the cases, these products are discharged directly into rivers and the surface of the land, causing a major pollution problem, especially during the harvest time. In the coffee processing, the pulp is obtained under conditions where the possibility of contamination is very high, because the industry's primary interest is not the pulp but the grain.

Due to this fact, this research examines the microbiological quality of the coffee pulp and the effect of various organic acids and one neutral detergent, to evaluate the possibility that this product has an alternative use as a raw material for future nutraceutical product or food products. Based on the results, it was established that, only two of organic acids acted significantly to reduce the initial microbial load on the coffee pulp, but even so, the decrease does not meet the standards set by international regulations. Therefore, additional studies using other types of disinfectants and increased the

concentrations of those already analyzed are necessary.

Introducción

En Costa Rica, según datos del Instituto del Café de Costa Rica (Icafé, 2005), para la cosecha 2004-2005, la producción de café fue de 670 800 toneladas métricas. Una vez que el fruto es recolectado, se pasa al beneficio para obtener el grano verde; después, este se procesa para obtener el café tostado que se consume a diario. El proceso de beneficiado genera una gran cantidad de subproductos; entre ellos, la broza, la cual, en algunos casos, se usa como abono orgánico y, en gran parte, es vertida a los ríos como desecho, por lo que pasa a ser una fuente de contaminación en afluentes con los daños ecológicos asociados (Gómez y Nicolás, 2006).

Adicionalmente, en este momento la sociedad a escala mundial, enfrenta un reto en el tema de la seguridad alimentaria, lo cual obliga a la modernización de nuestros sistemas de producción, no solo con el fin de asegurar los alimentos para el futuro, sino también al desarrollo de productos novedosos y el aprovechamiento de materias primas poco utilizadas, como lo es, en nuestro caso, la broza del café (Parker, 2005).

No obstante, como todo producto para consumo humano, se debe asegurar la inocuidad y la seguridad, para implementar dicha broza como ingrediente de futuros productos (Pouch e Ito, 2001). De ahí la importancia de aplicarle un proceso efectivo de desinfección, acompañado del análisis microbiológico correspondiente que valide la inocuidad de la carga, lo cual constituye el enfoque de la presente investigación.

El fruto del café (figura 1) es ovoide y está formado por el epicarpio o pulpa (broza), el mesocarpio o mucílago, el endocarpio o pergamino, espermodermo o película plateada y el endospermo o semilla (Flores, 1999).

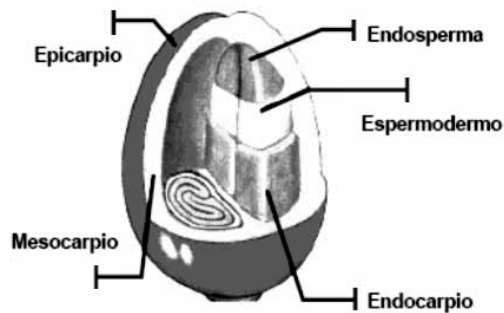


Figura 1. Sección transversal del fruto del café (Gómez y Nicolás, 2006).

La pulpa de café está compuesta principalmente por agua, fibra, proteína, azúcares, sustancias pécticas y fenoles (Elías, 1979). Cabe destacar que es de particular interés la abundancia de polifenoles presentes en esta, ya que desempeñan un rol importante en la prevención de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, las neurodegenerativas y el cáncer (Scalbert *et ál.*, 2005). En el caso específico de la broza del café, diversas investigaciones han revelado que las antocianinas – subgrupo de los compuestos fenólicos – son más estables bajo condiciones ácidas.

Adicionalmente, este efecto ha mostrado tener influencias positivas en la recuperación de las antocianinas así como otros fenoles, en jugos de mora (Kalt *et ál.*, 2000). Por esta razón, al pensar que la broza del café podría ser una materia prima para utilizarla en la industria de alimentos, se considera que la adición de ácido cítrico o ascórbico podría presentar, de igual manera, resultados positivos en la obtención de un producto que mantenga su color y, además, con alto contenido de antocianinas y polifenoles.

En la actualidad, la industria ofrece varios productos como los ácidos orgánicos, que pueden ser utilizados en los alimentos con el fin de disminuir el pH del producto y, a la vez, reducir la carga microbiana, por lo que

se planteó para este estudio la utilización de ácidos en soluciones que contengan broza de café y comprobar dicho efecto doble, pues al disminuir el pH se protege al producto del oscurecimiento debido a la acción de la enzima polifenoloxidadasa y, a la vez, actúa sobre los microorganismos presentes en el producto, reduciendo la carga microbiana.

De esta manera, en este trabajo se planteó que una vez desinfectada la broza del café, se evaluaría la posibilidad de utilizarla como materia prima para la producción de alimentos, siempre y cuando cumpliera con los niveles establecidos por el *Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08* (2009), el cual indica que el límite máximo es de 10^3 UFC para la carga microbiana total como recuento total aerobio y < 3 NMP/g para *Escherichia coli*, ambos bajo la especificación de frutas procesadas.

Metodología

El presente estudio evaluó el efecto del ácido peracético, el ácido láctico, el ácido cítrico y el ácido ascórbico sobre la carga microbiana total, y la de *Escherichia coli* en la broza del café costarricense, proveniente de un beneficio del Valle Central, con el fin de analizar su posible uso como materia prima para desarrollar productos alimentarios para consumo humano. Adicionalmente, y para comparar el poder desinfectante, se utilizó un detergente comercial apto para alimentos.

Plan de muestreo

El proyecto se llevó a cabo durante la temporada alta de producción de café, entre agosto y diciembre. Se realizaron cinco visitas para la colecta de muestras, a fin de evaluar la flora microbiana presente. Dichos muestreos se realizaron por la mañana, de manera que en horas de la tarde del mismo día se realizara el análisis microbiológico respectivo. Todas las muestras fueron obtenidas del mismo

beneficio, el cual recibe café de diversas zonas productoras del país y se ubica en el Valle Central.

Toma de las muestras

La toma de la muestra se realizó con equipo estéril y utilizando técnica aséptica para no comprometer su integridad. Para ello se tomó la muestra con guantes estériles de diversas áreas (parte superior, media y lateral del montículo de broza, así como directamente del suelo). Para transportar la muestra se utilizaron bolsas estériles con cierre hermético, en una hielera previamente esterilizada con alcohol al 70%. En cada muestreo y para cada tratamiento se tomaron aproximadamente 400 g de broza.

Limpieza y desinfección

Primeramente, y empleando la técnica aséptica, las muestras recién colectadas se mezclaron en una sola bolsa estéril. Posteriormente, fueron sometidas a un lavado con agua destilada estéril para eliminar suciedad y restos de materia orgánica que podrían interferir con la acción de los desinfectantes por utilizar.

Seguidamente, se procedió a aplicar los cuatro ácidos orgánicos certificados en la concentración recomendada por el fabricante, así como el detergente; una muestra se dejó para ser utilizada como control. Las concentraciones y características de los productos utilizados se describen a continuación:

- 1) Ácido peracético de la marca PerOxid, en una concentración de 85 ppm.
- 2) Ácido láctico natural, de la marca Purac FCC 88, al 0,5%.
- 3) Ácido cítrico, marca Red Star, grado alimentario, en una concentración del 2%.
- 4) Ácido ascórbico, marca Red Star, grado alimentario, en una concentración del 3%.
- 5) Detergente neutro, de la marca

Blendec, en una concentración de 0,1%.

El proceso de desinfección consistió en sumergir las muestras de broza en cada ácido y detergente durante 10 min. Concluido este tiempo, se realizó un lavado con agua destilada estéril. Posteriormente, se aplicó una solución neutralizante para eliminar cualquier residuo de los productos aplicados. En este punto, también se empleó una muestra de broza sin desinfectante como control.

Análisis microbiológico

El primer paso para el análisis microbiológico consistió en la homogenización y preparación de las muestras. Para esto, con una cuchara estéril, se tomaron aseptícamente 50 g de broza de cada muestra desinfectada y del control, los cuales fueron colocados en un frasco para licuadora, previamente esterilizado. Se adicionaron 450 mL de agua peptonada estéril y se procedió a homogenizar durante 1 min a velocidad baja en un homogenizador para alimentos (IUL Instruments S.A.). Esta dilución constituyó la dilución madre (10^{-1}), a partir de la cual se prepararon las diluciones decimales subsiguientes hasta llegar a 10^{-8} .

Con base en los lineamientos principales establecidos en el Bacteriological Analytical Manual (2005), así como en Gamazo *et ál.* (2000) y Pouch e Ito (2001), el procedimiento para el recuento total aerobio (RTA) y determinación del número más probable (NMP) de *Escherichia coli* de las muestras se describe a continuación.

a) Recuento total aerobio

Empleando una pipeta estéril, se depositó 1 mL de cada dilución en cada una de dos placas de Petri estériles, a las cuales, posteriormente, se les adicionó de 12 a 15 mL de agar estándar para recuento en placa. Después de mezclar cuidadosamente, y una vez que el agar solidificó, las placas fueron incubadas por (48 ± 2) horas

a $(35\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Al finalizar el periodo de incubación, se contaron todas las colonias presentes en las placas que contenían entre 25 y 250 colonias. Se calculó el promedio de las dos placas y se multiplicó por el recíproco de la dilución usada. El resultado se reportó como UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo.

b) Número más probable de *Escherichia coli*

Utilizando una pipeta estéril, se inoculó 1 mL de cada dilución en cada uno de los tres tubos con 10 mL de caldo lauril triptosa. Los tubos se incubaron en baño de agua a $(35\pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 24 y 48 ± 2 horas. Después de cada periodo de incubación, se seleccionaron los tubos positivos por producción de gas. A partir de los tubos positivos en la prueba anterior, se transfirió una gota con aplicador estéril a tubos con 10 mL de Caldo E.C., modificado con MUG. Los tubos fueron incubados a $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 24 y 48 horas. Después de cada periodo de incubación, se separaron los tubos positivos por presencia de turbiedad y producción de gas.

Se agregaron 0,5 mL de NaOH 0,5 M a cada tubo positivo y se agitó para mezclar. Los tubos fueron examinados (en oscuridad) por fluorescencia, iluminándolos con una lámpara de luz ultravioleta de onda larga (360-366 nm). Posteriormente, se agregaron 0,5 mL de reactivo de Kovacs a cada tubo que presentó fluorescencia y se mezcló bien (en vortex), para examinarlos después de un minuto de reposo. La presencia de un color rojo en la fase alcohólica (parte superior) indicó la existencia de Indol, por

Cuadro 1. Recuento total aerobio (UFC/placa) para dos muestras de broza de café recién recolectadas.

Muestra	Repetición 1	Repetición 2
Beneficio	$9,1 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$

UFC: Unidades formadoras de colonia.

lo que todos los tubos positivos para esta prueba fueron reportados con presencia de *Escherichia coli*. El NMP por g se calculó con el índice de la tabla de NMP (número más probable).

Análisis estadístico

Para el análisis de varianza de los datos se empleó un diseño en bloques, agrupando cada recuento microbiológico de acuerdo con el día de muestreo. Esto porque se sospechó que el día que se tomó la muestra podría representar una fuente potencial de variabilidad, debido a cambios climatológicos, variaciones en el tiempo de exposición de la broza a la intemperie, diferentes procedencias del café, variaciones en el proceso, entre otras. La variable por analizar fue el recuento total aerobio para cada tratamiento de desinfección en unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g), con el objetivo de determinar si existía diferencia significativa en los recuentos entre desinfectantes. Para realizar los cálculos estadísticos, se utilizó el paquete estadístico JMP4.

Resultados y discusión

Para tener una idea de la carga microbiológica de la broza inicial, se hizo un recuento total aerobio (RTA); los resultados se muestran en el cuadro 1.

A partir de dichos datos, se confirmó que las muestras de broza de café recolectadas en el beneficio presentaban una carga microbiana inicial sumamente alta, lo cual demuestra que este producto no puede ser utilizado con fines de consumo humano o industrialización; por lo tanto, justifica el estudio del uso de los ácidos y el detergente como desinfectantes.

Una vez aplicados los ácidos y el detergente mencionados, se evaluó su efecto sobre los microorganismos de la broza. Los resultados obtenidos del recuento total aerobio (RTA) y número más probable

Cuadro 2. Promedio de los análisis microbiológicos de la broza, proveniente de un beneficio del Valle Central, al aplicar ácidos orgánicos y un detergente orgánico en muestras recolectadas en diferentes meses del año.

Muestra 1		
Desinfectante	RTA (UFC/placa)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)
Control (sin desinfectante)	4,0 x 10 ⁷	< 3,0
Ácido peracético	7,2 x 10 ⁴	< 3,0
Detergente neutro	3,9 x 10 ⁵	< 3,0
Ácido láctico	7,6 x 10 ⁵	< 3,0
Ácido cítrico	2,5 x 10 ⁶	< 3,0
Ácido ascórbico	4,6 x 10 ⁵	< 3,0
Muestra 2		
Desinfectante	RTA (UFC/placa)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)
Control (sin desinfectante)	4,3 x 10 ⁷	< 3,0
Ácido peracético	1,5 x 10 ⁴	< 3,0
Detergente neutro	3,4 x 10 ⁵	< 3,0
Ácido láctico	5,8 x 10 ⁶	< 3,0
Ácido cítrico	9,0 x 10 ⁵	< 3,0
Ácido ascórbico	4,0 x 10 ⁴	< 3,0
Muestra 3		
Desinfectante	RTA (UFC/placa)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)
Control (sin desinfectante)	6,4 x 10 ⁸	> 1100
Ácido peracético	3,6 x 10 ⁶	> 1100
Detergente neutro	5,8 x 10 ⁷	> 1100
Ácido láctico	5,5x 10 ⁷	> 1100
Ácido cítrico	3,5 x 10 ⁷	> 1100
Ácido ascórbico	1,7 x 10 ⁶	> 1100
Muestra 4		
Desinfectante	RTA (UFC/placa)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)
Control (sin desinfectante)	5,4 x 10 ⁷	> 1100
Ácido peracético	1,9 x 10 ⁴	> 1100
Detergente neutro	4,5 x 10 ⁶	> 1100
Ácido láctico	3,5 x 10 ⁵	> 1100
Ácido cítrico	5,0 x 10 ⁶	> 1100
Ácido ascórbico	2,4 x 10 ⁴	> 1100
Muestra 5		
Desinfectante	RTA (UFC/placa)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)
Control (sin desinfectante)	5,0 x 10 ⁷	> 1100
Ácido peracético	3,5 x 10 ⁴	1100
Detergente neutro	4,4 x 10 ⁶	> 1100
Ácido láctico	5,6 x 10 ⁶	> 1100
Ácido cítrico	5,0 x 10 ⁵	> 1100
Ácido ascórbico	3,2 x 10 ⁴	1100

(NMP) de *Escherichia coli* se muestran en el cuadro 2.

A partir del análisis estadístico, las medias correspondientes al recuento total aerobio de las diez muestras de broza obtenidas para cada uno de los desinfectantes se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Recuento total aerobio de la broza del café para cinco desinfectantes orgánicos, expresado como log 10 UFC/g.

Desinfectante	Media ^a	Error estándar
Control	7,894 ^a	0,212
Ácido peracético	4,882 ^b	0,212
Detergente neutro	6,440 ^a	0,212
Ácido láctico	6,535 ^a	0,212
Ácido cítrico	6,460 ^a	0,212
Ácido ascórbico	5,080 ^b	0,212

* Letras diferentes indican diferencias significativas.

Con base en el análisis estadístico de los datos, se establece que sí existe diferencia significativa entre los recuentos bacterianos obtenidos con cada producto y con respecto al control. De manera complementaria, al comparar las medias por medio de una prueba de Tukey, se encontró que el resultado obtenido con los desinfectantes ácido peracético y ácido ascórbico es estadísticamente equivalente. Por tanto, se concluye que estos dos tratamientos fueron los más efectivos en reducir la carga microbiana total de la broza, pues presentan el recuento total aerobio más bajo entre todos los desinfectantes.

En cuanto a la presencia de *Escherichia coli*, como se observa en el cuadro 2, con excepción de los dos primeros muestreos,

Los ácidos peracético y ascórbico sí tuvieron un efecto en la disminución de la carga microbiana total; sin embargo, ninguno de los productos disminuyó a un nivel aceptable de la carga de Escherichia coli al límite máximo 10^3 , lo cual hace que bajo estas condiciones de tratamiento el producto no es aceptable para ser usado como materia prima para producir alimentos.

en todos los casos se encontró la máxima cantidad de microorganismo que es posible detectar con esta prueba. Este resultado coincide con el inicio de las lluvias, varios fenómenos climáticos fuertes y el aumento en el volumen de procesamiento de café en el beneficio, razones que pudieron influenciar dichos resultados. De esta manera, se concluye que ninguno de los productos probados presenta una acción desinfectante efectiva contra concentraciones altas de *Escherichia coli*.

Una de las posibles causas de la baja acción de la mayoría de los desinfectantes podría atribuirse a la presencia de abundante materia orgánica en la broza (ramas, hojas, tierra), la cual, debido a la naturaleza orgánica de los productos aplicados, podría interferir en la acción de los estos (Holaj *et ál.*, 1998).

No obstante, resulta importante considerar que con base en los lineamientos de la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos ICMSF, 2008, la disminución en el recuento microbiológico obtenida con los desinfectantes de ácido peracético y ascórbico no es suficiente para considerar la broza como materia prima segura (límite máximo 10^3). Por consiguiente, se recomienda realizar más pruebas, aumentando la dosis de los dos desinfectantes que mostraron mejores resultados y considerando que dicha cantidad no sobrepase los niveles permitidos para dichos químicos. También debe considerarse que la broza analizada contiene una carga microbiana inicial sumamente elevada, por lo que la futura aplicación como materia prima de dicha broza posiblemente implicaría cambios en los métodos actuales de procesamiento del café.

Conclusiones

De los métodos tradicionales utilizados para la desinfección de productos alimentarios, los ácidos y el detergente que se probaron para reducir la carga microbiana a niveles

aceptables no dio resultados positivos con la broza de café utilizada. Se encontró que los ácidos peracético y ascórbico sí tuvieron un efecto en la disminución de la carga microbiana total; sin embargo, ninguno de los productos disminuyó a un nivel aceptable de la carga de *Escherichia coli* al límite máximo 10^3 , lo cual hace que bajo estas condiciones de tratamiento el producto no es aceptable para ser usado como materia prima para producir alimentos.

Bibliografía

- BAM. (2005). Bacteriological Analytical Manual. U.S. Food and Drug Administration. Departamento de Salud y Servicios Humanos. Estados Unidos. Disponible en: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>>.
- Costa Rica. Ministerio de Economía Industria y Comercio. (2009). *Reglamento Técnico Centroamericano*. RTCA 67.04.50:08. Alimentos criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos.
- Elias, L. (1979). *Coffee pulp composition, technology and utilization*. International Development Research Centre. Canadá.
- Flores, E. (1999). *La Planta: Estructura y Función*. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- Gamazo, C.; Lopez-Goñi, I. & Díaz R. (2000). Manual Práctico de Microbiología. Segunda Edición. Editorial Masson. Barcelona, España.
- Gómez, L; Nicolas, J. (2006). *Producción de alcohol etílico a partir de mucílago de café*. Tesis Licenciatura. EARTH, Escuela Agricultura de trópico húmedo.47 p.
- Holaj, J.; Lavaud, A.; Peters W. & Dye K. A. (1998). *Future Techniques for Disinfectant Efficacy Testing*. International Biodeterioration & Biodegradation. 41(1): 273-279.
- Icafé (2005). Instituto del Café de Costa Rica. Sitio oficial en línea. Disponible en:http://www.icafe.go.cr/sector_cafetalero/estadsticas/estadisticas.html>.
- ICMSF. (2008). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Sitio oficial en línea. Disponible en: <<http://www.icmsf.iit.edu/main/home.html>>.

Kalt, W; McDonald, J; Donner, H. (2000). *Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products*. Journal of food science. 65:390-393.

Parker, P. M. (2005). *The World Market for Coffee Husks, Coffee Skins, and Coffee Substitutes Containing Coffee: A 2005 Global Trade Perspective*. ICON Group International, Inc. Disponible en: <<http://www.icongrouponline.com>>.

Pouch F., Ito, K. (2001). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Cuarta Edición. American Public Health Association. Washington DC, Estados Unidos.

Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. (2004). *Polyphenols: Food Sources and Bioavailability*. American. Food Clinic Nutricion 79:727-747