

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Departamento de Agroindustria Alimentaria**  
**Ingeniería en Agroindustria Alimentaria**



Proyecto Especial de Graduación

**Cuantificación de flavonoides y polifenoles totales en extracto acuoso de pulpa de café (*Coffea arabica* var. *Parainema*) y la evaluación de su inhibición de microorganismos patógenos.**

Estudiante

Marvin Alejandro Duarte Cabus

Wilmer Anel Zapata Branda

Asesores

Luis F. Maldonado, Ph.D.

Ligia Luna, M.Sc.

Honduras, noviembre 2023

**Autoridades**

**SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO**

Rector

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**ADELA M. ACOSTA MARCHETTI**

Directora del departamento de Agroindustria Alimentaria

**HUGO ZAVALA MEMBREÑO**

Secretario General

## Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras .....	6
Índice de Anexos.....	7
Resumen .....	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	13
Ubicación del Estudio.....	13
Tipo de Estudio .....	13
Descripción de Tratamientos .....	13
Preparación de Muestras.....	14
Obtención del Extracto Acuoso de Pulpa de Café .....	15
Análisis de pH.....	15
Determinación de Grados Brix.....	16
Determinación de Flavonoides Totales.....	16
Determinación de Polifenoles.....	16
Acidez Titulable.....	17
Evaluación de Actividad Antimicrobiana .....	18
Diseño Experimental.....	19
Resultados y Discusión.....	20
Medición de pH y °Brix.....	20
Acidez Titulable.....	20
Análisis de Flavonoides Totales .....	21
Análisis de Polifenoles Totales.....	23

Evaluación de Actividad Antimicrobiana .....	26
Conclusiones .....	29
Recomendaciones .....	30
Referencias.....	31
Anexos.....	34

### Índice de Cuadros

Cuadro 1 Descripción de Tratamientos.....	14
Cuadro 2 Resultados de medición de pH y °Brix para cada Tratamiento analizado.....	20
Cuadro 3 Acidez titulable expresada como ácido clorogénico en los extractos acuosos de pulpa seca de café.....	21
Cuadro 4 Resultado de contenido de flavonoides totales expresados como mg equivalentes de catequina por 100 g de pulpa de café.....	22
Cuadro 5 Resultado de contenido de polifenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de pulpa de café.....	24
Cuadro 6 Correlación entre pH y contenido de compuestos bioactivos en los extractos acuosos de pulpa de café.....	26
Cuadro 7 Análisis de sensibilidad de discos de E. coli, Salmonella Typhimurium y Salmonella Poona (mm) frente a extractos acuosos de pulpa de café .....	27
Cuadro 8 Probabilidades para la interacción de la acidez titulable, polifenoles totales, flavonoides totales, pH y °Brix sobre la sensibilidad de Salmonella Typhimurium, Salmonella Poona y Escherichia Coli .....	28

### Índice de Figuras

Figura 1 Balance de materia de dilución sólido líquido .....	15
Figura 2 Método de siembra AST (pruebas de susceptibilidad a los antibióticos por sus siglas en inglés) estándar de la OMS (Organización Mundial de la Salud) .....	19
Figura 3 Cuantificación de flavonoides totales mediante espectrofotómetro UV-VIS.....	23
Figura 4 Cuantificación de polifenoles mediante espectrofotómetro UV-VIS.....	25

**Índice de Anexos**

Anexo A Curva estándar de catequina.....	34
Anexo B Curva estándar de ácido gálico.....	35
Anexo C Materia prima del experimento.....	36
Anexo D Dilución Sólido-Líquido.....	37
Anexo E Realización de antibiogramas.....	38
Anexo F Resultados de antibiogramas.....	39

## Resumen

La pulpa de café es un subproducto del procesamiento del café que puede ser perjudicial para el ambiente. Sin embargo, esta contiene compuestos bioactivos beneficiosos, como polifenoles y flavonoides, que tienen propiedades antioxidantes. En el presente estudio se evaluaron pulpas de café variedad Parainema procesadas de forma diferente. Para ello, se evaluaron pulpas secas obtenidas de los procesos natural y lavado, concentrado de pulpa de café diluido del proceso de lavado y natural. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con separación de medias Duncan y un análisis de correlaciones entre las variables evaluadas. Los extractos acuosos de pulpa de café presentaron flavonoides y polifenoles totales en un rango de 89-315 mgEC/100 g y 134-287 mgEAG/100 g, respectivamente. La pulpa seca del proceso lavado presentó la mayor concentración de compuestos bioactivos. Además, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de pulpa de café frente a tres microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Poona*. El mayor efecto inhibitorio se observó contra *Salmonella Typhimurium* con un halo de inhibición de  $9.68 \pm 1.15$  mm para el extracto acuoso del proceso de lavado, seguido de *Salmonella Poona* y *E. coli*. En general, los extractos de pulpa de café de proceso lavado presentaron mayor actividad antimicrobiana, pero esto no tuvo correlación con su contenido de compuestos bioactivos. Los resultados de este estudio podrían contribuir a desarrollar nuevos productos y aplicaciones para la pulpa de café ayudando a reducir el impacto ambiental de la producción de café.

*Palabras clave:* Antimicrobiano, compuestos bioactivos, impacto ambiental, subproducto.



### Abstract

Coffee pulp is a by-product of coffee processing that can be harmful to the environment. However, it contains beneficial bioactive compounds, such as polyphenols and flavonoids, which have antioxidant properties. In the present study, pulps of the Parainema variety of coffee processed in different ways were evaluated. For this purpose, dry pulps obtained from the natural and washed processes, diluted coffee pulp concentrate from the washed and natural processes were evaluated. A Completely Randomized Design with a Duncan mean separation and an analysis of correlations between the variables evaluated. The aqueous extracts of coffee pulp presented flavonoids and total polyphenols in a range of 89-315 mgCE/100 g and 134-287 mgGAE/100 g, respectively. The dried pulp from the washed process presented the highest concentration of bioactive compounds. In addition, the antimicrobial activity of aqueous coffee pulp extracts was evaluated against three pathogenic microorganisms: *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Poona. The highest inhibitory effect was observed against *Salmonella* Typhimurium with an inhibition halo of  $9.68 \pm 1.15$  mm for the aqueous extract from the washing process, followed by *Salmonella* Poona and *E. coli*. In general, the washed process coffee pulp extracts presented greater antimicrobial activity, but this did not correlate with their content of bioactive compounds. The results of this study could contribute to the development of new products and applications for coffee pulp, helping to reduce the environmental impact of coffee production.

*Keywords:* Antimicrobial, bioactive compounds, by-product, environmental impact.

## Introducción

A nivel mundial, el café juega un papel importante para la economía, ya que este se produce en más de 50 países a nivel mundial y es una de las bebidas más consumidas. El café es uno de los productos básicos de exportación más importantes del mundo, la cosecha 2020-2021 se estima en 228 millones de sacos de 46 kg, de los cuales Honduras ofreció 7.66 millones de sacos de 46 kg (Bustamante, 2022). La composición fisiológica del fruto se divide en dos partes mayoritarias, que son el grano y la pulpa. Para lograr comercializar el grano, es necesario realizarle a las cerezas una remoción y limpieza dependiendo del proceso fermentativo que se le haya realizado, por medio de condiciones húmedas o secas. A partir del procesamiento húmedo se originan diversos subproductos del café, los cuales son considerados principalmente como desecho, de los cuales, la pulpa de café representa el 55 % del fruto entero (Chalalai et al., 2015; Pushpa y Naidu, 2012).

La pulpa de café es considerada un subproducto perjudicial para el ambiente, debido a que puede causar contaminación del agua y del suelo; además, su uso como alimentación animal está limitado porque se considera un alimento peligroso por los compuestos que contiene, como los polifenoles y la cafeína (López et al., 2013). Los componentes de la pulpa de café son categorizados como compuestos bioactivos, debido a que poseen propiedades antioxidantes y biológicas, las cuales son posibles de potenciar o extraer mediante la formulación de extractos de pulpa de café por medio de distintos solventes y bajo diversas condiciones. Un estudio demostró que la pulpa de café contiene componentes como cafeína, sales minerales, aminoácidos, taninos, fenoles y otros polifenoles (Geremu et al., 2016). Estos compuestos polifenólicos presentes en los extractos de pulpa de café poseen la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano como se reportó en un estudio realizado por S. Martínez et al. (2019).

La pulpa es una fuente importante de compuestos fenólicos. Estos están conformados por: los flavonoides, los cuales poseen una estructura de 2-fenilcromano ( $C_6-C_3-C_6$ ) formado por un anillo bencénico unido a un anillo heterocíclico primario y en la posición 2 unido a un anillo fenilo, siendo

los flavonoles, los flavan-3-oles y las antocianinas, que son las principales subclases presentes en la pulpa de café; los ácidos fenólicos, que se subdividen en ácidos hidroxibenzoicos (estos presentan un grupo carboxílico y uno o más grupos hidroxilo en un anillo aromático); por último, los ácidos hidroxicinámicos (cambiando el grupo carboxilo por el grupo  $\text{CH}=\text{COOH}$ ), destacan estos últimos en pulpa de café como ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido clorogénico (Brglez Mojzer et al., 2016; Peñarrieta et al., 2014).

Según Pérez et al. (2015), algunos componentes del café como melanoidinas, ácidos fenólicos, ligninas y cafeína tienen propiedades antioxidantes. Lo cual concuerda con lo mencionado en el estudio de Mercado et al. (2013), donde menciona que la mayoría de los métodos *in vitro* han demostrado que los polifenoles son efectivos como antioxidantes, sin embargo, los estudios *in vivo* arrojan resultados no concluyentes, ya que estos enlaces pueden hidrolizarse mediante la adición de enzimas, lo que lleva a la liberación de enlaces unidos (fenoles). Esto último se respalda con lo reportado por Pinelo et al. (2006), quien menciona que la extracción asistida enzimáticamente es una de las técnicas más eficaces para aumentar el rendimiento de fenoles, además de que esto puede ser utilizado para inhibir el crecimiento de microorganismos por su alta cantidad de compuestos bioactivos y antioxidantes (S. Martínez et al., 2019).

Es por esto, en este proyecto se planteó realizar una cuantificación de compuestos bioactivos, más específicamente los flavonoides y polifenoles totales, para determinar la relación de dicho contenido con los procesos a los que se sometió la pulpa utilizada. También se evaluó la capacidad inhibitoria sobre microorganismos patógenos, de las muestras de pulpa de café de una misma variedad, que fueron procesadas de distinta manera. Las muestras comprenden dos pulpas secas de café de la variedad Parainema, una de proceso lavado y otra de proceso natural; para las otras dos muestras, se utilizaron dos extractos de las mismas pulpas, con la diferencia que estos pasaron por un proceso de concentración enzimática para luego pasar a un concentrador al vacío de la marca REDA®. Estas cuatro muestras se evaluaron en igualdad de condiciones utilizando como parámetro principal

los sólidos solubles presentes en las extracciones realizadas en el laboratorio. Por lo tanto, los objetivos del presente estudio fueron extraer los compuestos bioactivos de la pulpa seca de café (var. Parainema) de los procesos natural y lavado, realizar una cuantificación de polifenoles y flavonoides totales en los extractos acuosos de pulpa de café y analizar la capacidad inhibitoria de los extractos acuosos de pulpa seca de café frente a *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Poona y *E. coli* spp.

## Materiales y Métodos

### Ubicación del Estudio

El estudio se llevó a cabo con el producto de la planta Biofortune Crops Honduras, ubicada en Teupasenti, El Paraíso. Esta región es perteneciente al clima tropical de sabana. Los experimentos se realizaron en el Laboratorios de Análisis de Alimentos (LAAZ) y el Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LMAZ), de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano ubicado en el kilómetro 30 de la carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle de Yeguaré, San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras.

### Tipo de Estudio

Se realizó un estudio con el fin de realizar una cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de pulpa seca de café, como lo son flavonoides y polifenoles totales. Como segunda parte del experimento se probó la acción inhibitoria de compuestos bioactivos del café frente a tres microorganismos patógenos, los cuales fueron *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Poona*. Este tipo de estudio permitió analizar y comparar la capacidad de inhibir dichos microorganismos tomando en cuenta parámetros como las diluciones de extracción y las especies de microorganismos.

### Descripción de Tratamientos

En el Cuadro 1 se muestran los Tratamientos para los diferentes análisis realizados. El proyecto constó de dos fases principales, de las cuales, en la primera se realizó la caracterización de los compuestos bioactivos de la pulpa seca del café (*Coffea arabica* var. Parainema) y la segunda fase evaluó el efecto inhibitorio de los extractos de pulpa de café frente a tres microorganismos patógenos.

Para los Tratamientos 1 y 2 se utilizaron dos muestras de extracto acuoso de pulpa seca de café, teniendo procesos diferentes (proceso natural y proceso lavado). Los Tratamientos 3 y 4 fueron concentrados por medio de un concentrador al vacío de la marca REDA®, teniendo dos materias primas con dos procesos diferentes (proceso natural y proceso lavado).

## Cuadro 1

### Descripción de Tratamientos

Materia prima	Tratamiento	Variedad	Proceso
Extracto de Pulpa seca	T1	Parainema	Natural
Extracto de Pulpa seca	T2	Parainema	Lavado
Concentrado diluido	T3	Parainema	Lavado
Concentrado diluido	T4	Parainema	Natural
Concentrado*	Control	Parainema	Lavado
Concentrado*	Control	Parainema	Natural

*Nota.* \* Infusión concentrada de pulpa de café (lavado 58.6 °Brix y natural 61.5 °Brix).

Se realizaron tres repeticiones por cada Tratamiento, lo cual equivale a 18 unidades experimentales. Se evaluaron polifenoles totales, flavonoides totales, acidez titulable, pH y halo de inhibición en mm. Los resultados se evaluaron por medio de un Diseño Completamente al Azar (DCA) y una separación de medias Duncan, tomando en cuenta que no hay correlación entre muestras a evaluar, pero si entre resultados obtenidos. Los análisis fueron realizados en el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.4.

### Preparación de Muestras

En el caso de las muestras de pulpa seca de café, se realizó una molienda por medio de un molino de café KitchenAid®, modelo BCG111OB y se procedió a realizar la extracción por medio del método solido-líquido. Se midió el pH y los grados Brix. Para las muestras de los Tratamientos 3 y 4, se realizó una dilución para llevar el concentrado de 58.6 y 61.5 °Brix, hasta los 13 °Brix con una proporción 1:5 y 1:6.8, respectivamente. Esta dilución se realizó para que tanto los Tratamientos de concentrados diluidos como los extractos acuosos estuvieran en igualdad de grados Brix al momento de su evaluación.

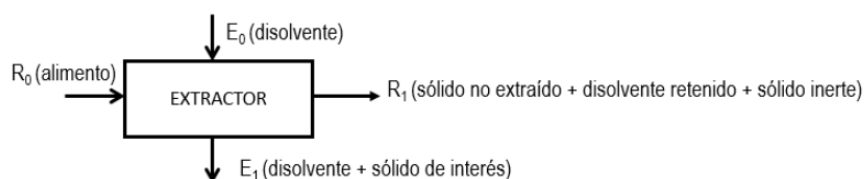
Los controles utilizados fueron muestras de los concentrados proporcionados por la empresa Biofortune Crops Honduras. Dicho producto se obtiene de una concentración enzimática en la cual se utilizan tres formulas comerciales, estas son: Pectinex Yieldmash Plus®, Pectinex Ultra Pulp® y Pectinex BE XXL® previo a ser ingresado a una concentradora al vacío de la marca REDA®.

### Obtención del Extracto Acuoso de Pulpa de Café

Se realizó una extracción sólido-líquido (Figura 1) con una proporción de 40% de agua y 60% de etanol al 95%. Se pesaron 15.63 g de pulpa molida de café, se mezclaron 100 mL de agua destilada más 150 mL del etanol, y se llevó la solución hasta 75 °C en un periodo de 8 minutos. Se añadieron los 15.63 g de pulpa molida y se mantuvo en agitación constante durante 8 min. Luego de transcurrido el tiempo, se realizó una filtración con papel filtro de 3 ¼ para café y se procedió a hacer dos centrifugaciones a 6000 rpm durante cinco minutos en una centrífuga de la marca VWR®, modelo Symphony 4417R. Se separó el precipitado del sobrenadante, y se le realizaron los análisis a este último.

**Figura 1**

*Balance de materia de dilución sólido líquido*



*Nota.* Esquema de una etapa de extracción sólido-líquido. (Castelló et al., 2020)

Se realizó una roto-evaporación de los extractos acuosos de café para eliminar el contenido de etanol en los mismos y evitar que estos causaran interferencia en los análisis posteriores, en caso de los Tratamientos 3 y 4 (concentrados diluidos de pulpa de café), se llevó la solución a 13 °Brix y se procedió a hacer dos centrifugaciones a 6000 rpm durante cinco minutos. Se separó el precipitado del sobrenadante, y se le realizaron los análisis a este último.

### Análisis de pH

Luego de la preparación de las muestras, se le realizó una medición de pH con la ayuda de un potenciómetro pHScan2, esto debido a que los niveles de pH de los extractos de pulpa seca de café ayudan a determinar la correcta maduración de los frutos de los cuales se obtuvieron dichos subproductos, puesto que la pulpa de café es un subproducto ácido, ya que presenta pH con valores

por debajo de 5, lo que puede ocasionar problemas de toxicidad por aluminio en los suelos donde se deposita para compostarla (Fierro y Morales, 2018). También ayuda a determinar qué tan eficiente son las materias primas en cuanto a contenido de polifenoles. Esto concuerda con Rovira (2016) que indica que el pH es además una variable influyente en la recuperación de compuestos fenólicos.

#### **Determinación de Grados Brix**

Por otra parte, los grados Brix fueron medidos para determinar el punto de homogeneidad de todas las muestras a analizar, siendo este 13° Brix. Por otra parte, los °Brix fueron medidos con un refractómetro de la marca ATAGO PAL-BX|ACID15, para determinar el punto de homogeneidad de todas las muestras a analizar.

#### **Determinación de Flavonoides Totales**

Los flavonoides totales se determinaron siguiendo la metodología reportada por Zhishen et al. (1999) con algunas modificaciones. Brevemente, se extrajeron 600 µL del extracto acuoso de cada muestra de pulpa de café. Se le colocaron a cada muestra 2.58 mL de la solución A, compuesta por: 1.8 mL de NaNO<sub>2</sub> al 5% más 24 mL de agua desionizada. Se dejó reposar por 5 min y luego se adicionó 180 µL de AlCl<sub>3</sub> al 10%. Se dejó reposar por 1 min. Por último, se adicionó 2.52 mL de la solución B, compuesta por: 12 mL de NaOH 1M más 14.4 mL de agua desionizada. Luego se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS (Cary 8454, Agilent Technologies, EUA) a 415 nm.

Los resultados se expresaron en EC (equivalente de catequina) 100 gramos<sup>-1</sup> pulpa de café utilizando una curva estándar de catequina con un R<sup>2</sup>=0.9996.

#### **Determinación de Polifenoles**

Se utilizó el método descrito por García et al. (2015) con modificaciones. Para realizar la determinación de los compuestos polifenólicos en la muestra, se tomaron 60 µL de cada solución del sobrenadante procedente de la extracción de los compuestos polifenólicos, y se colocaron en tubos de ensayo de 15 mL. A continuación, añadir 3 mL de agua destilada y 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1N). Homogeneizar el contenido de los tubos de ensayo y dejar reposar durante 5 minutos



a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, adicionar a cada tubo 750  $\mu\text{L}$  de la solución de carbonato de sodio al 20 % y adicionar 950  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Homogeneizar los tubos y mantener a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, medir la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 765 nm.

Los resultados se expresaron en EAG (equivalente de ácido gálico) 100 gramos<sup>-1</sup> pulpa de café utilizando una curva estándar de ácido gálico con un  $R^2=0.9960$ .

### Acidez Titulable

Para la determinación de acidez titulable, se utilizó el método 942.15 de la Association of Official Analytical Collaboration (AOAC, 2000) con algunas adecuaciones. Se realizó la extracción con una relación 1:15 de pulpa de café y agua destilada, se tomaron 10 mL de la solución y se le añadió agua destilada hasta aforar a 250 mL. Se separaron 100 mL y se añadieron 0.3 mL de fenolftaleína al 1%.

Se llenó una bureta con 25 mL de NaOH 1M y se montó en un pedestal con abrazadera. Se mantuvo la muestra en agitación y se le añadió por gotas el NaOH hasta que se alcanzara un pH de 8.2 o hasta que cambiara la coloración de la solución a un rosado tenue.

Los resultados se expresaron como mg de ácido clorogénico/g de pulpa de café, los mismos fueron calculados siguiendo la fórmula utilizada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC, 2004)

$$\frac{\text{mg Acido Clorogénico}}{\text{g Pulpa de café}} = \frac{V(\text{NaOH}) * M(\text{NaOH}) * FD * MW * L * G}{P} \quad [1]$$

Donde:

V (NaOH): Volumen de NaOH, mL.

M (NaOH): Concentración molar del NaOH, N.

FD: Factor de dilución.

MW: Peso molecular del ácido clorogénico, 354.31 g/mol

L: Equivalencia de litro a mililitros (1L/1000 mL).

G: Equivalencia de miligramos a gramos (1000 mg/g).

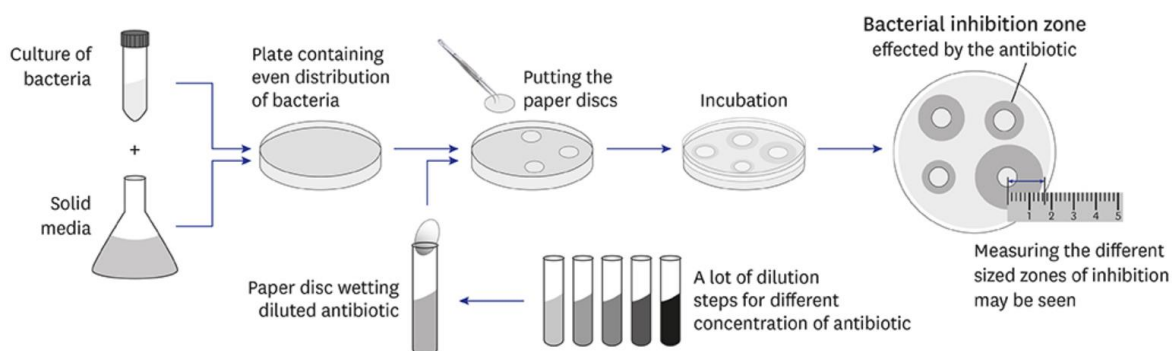
### **Evaluación de Actividad Antimicrobiana**

El método utilizado para los análisis de potencial inhibitorio de los compuestos bioactivos extraídos sobre los microorganismos fue el método del análisis de difusión por disco. Para ello se siguió la metodología reportada por Tobo (2009), con algunas modificaciones. Se utilizaron cepas del American Type Culture Collection (ATCC) de *E. coli* (ATCC 32219), *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Poona. Se preparó la suspensión de las cepas en buffer de fosfato de acuerdo con el tubo patrón de la escala de McFarland 0.5, ésta corresponde a una suspensión homogénea de  $1.5 \times 10^8$  células por mililitro cúbico (BD, 2005), esto para determinar un aproximado del número de bacterias presentes en la solución de buffer de fosfato. Previo a esto, se realizaron confirmaciones de cada una de las cepas para luego proceder a realizar una siembra por el método de siembra masiva para el análisis de Kirby-Bauer (Figura 2) utilizadas por Bernal y Guzmán (1984). El Manual Terrestre de la OIE (Gacto, 2019) indica que, tanto las bacterias como otros microorganismos utilizados en las AST (Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, por sus siglas en inglés) deben proceder de un cultivo fresco de 24 horas. Cada plato petri contenía 15 mL de Agar Cuenta Estándar (ACE) y dos discos estériles de 6.35 mm de papel filtro Whatman No. 1, impregnado con 10  $\mu$ L del extracto acuoso de cada Tratamiento y control evaluado. Se utilizaron tres controles, siendo etanol al 95%, concentrado de café de proceso natural (61.5°Brix) y concentrado de café de proceso lavado (56.8°Brix). Las placas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas. Terminado el tiempo de incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición frente a los microorganismos, como indica Picazo (2000) después de 18 horas de incubación leer el diámetro de las zonas de completa inhibición con un pie de rey o regla, de tal forma que el diámetro es proporcional a la sensibilidad de la bacteria al antimicrobiano presente en el disco. Se consideró como positivo el efecto antimicrobiano cuando el halo superó 1 mm de inhibición (Kalemba y Kunicka, 2003).

**Figura 2**

*Método de siembra AST (pruebas de susceptibilidad a los antibióticos por sus siglas en inglés)*

*estándar de la OMS (Organización Mundial de la Salud)*



*Nota.* Procedimientos clínicos para AST. Los objetivos convencionales de la AST son detectar posible resistencia a los medicamentos contra patógenos comunes y confirmar la susceptibilidad al medicamento de elección para infecciones particulares. (Jung et al., 2018).

### Diseño Experimental

En el presente estudio se evaluaron pulpas de café variedad Parainema procesadas de forma diferente. Para ello, se evaluaron los extractos acuosos preparados con las pulpas secas obtenidas de los procesos natural y lavado (T1 y T2), concentrado de pulpa de café diluido del proceso de lavado y natural (T3 y T4 concentrados diluidos). Se analizó la concentración de flavonoides y polifenoles totales en ellos y el diámetro de los halos de inhibición reportados en la evaluación antimicrobiana de los extractos acuosos de café frente a las cepas *E. coli* (ATCC 32219), *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Poona. Los resultados fueron evaluados utilizando un análisis de varianza (ANDEVA), con una separación de medias Duncan, para confirmar la existencia o no de diferencias significativas entre los Tratamientos evaluados. También se realizó un análisis de correlación de Pearson para evaluar la relación entre las variables, esto con una significancia del 95% ( $P < 0.05$ ).

## Resultados y Discusión

### Medición de pH y °Brix

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de la medición de pH y °Brix de cada Tratamiento y repetición realizada. Los valores obtenidos en el presente estudio se encontraron en un rango de pH de 3.79 a 5.04. por lo cual se puede definir que, a excepción del Tratamiento 1, todos los Tratamientos estuvieron dentro de lo normal. Como indica Fierro y Morales (2018), la pulpa de café es un subproducto ácido, ya que presenta pH con valores por debajo de 5.

### Cuadro 2

*Resultados de medición de pH y °Brix para cada Tratamiento analizado*

Materia prima	Proceso	Tratamiento	pH ± DE	CV (%)	°Brix ± DE	CV (%)
Extracto de Pulpa seca	Natural	T1	5.04 ± .042 <sup>a</sup>	8.29	13.60 ± 0.53 <sup>b</sup>	3.89
Extracto de Pulpa seca	Lavado	T2	4.25 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.65	13.30 ± 0.36 <sup>b</sup>	2.71
Concentrado diluido	Lavado	T3	4.56 ± 0.48 <sup>a</sup>	10.49	13.13 ± 0.23 <sup>b</sup>	1.76
Concentrado diluido	Natural	T4	4.34 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.04	13.17 ± 0.38 <sup>b</sup>	3.37
Concentrado*	Lavado	Control 1	3.83 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.09	58.64 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.18
Concentrado*	Natural	Control 2	3.79 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.43	61.42 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.15

*Nota.* DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación. \* Infusión concentrada de pulpa de café. *Los valores<sup>a-b</sup> de medias seguidas de letras distintas indican diferencias entre los Tratamientos (p<0.05).*

Con lo presentado anteriormente, se puede definir que el estado fisiológico de los granos de café, de los cuales se extrajo la pulpa, se encontraba en su punto de maduración adecuado y que efectivamente, el análisis se realizó con el subproducto del proceso normal de producción de café.

### Acidez Titulable

La acidez titulable (Cuadro 3) ayuda a estimar el contenido de ácido clorogénico presente en el extracto acuoso de pulpa seca de café, siendo que este es el principal ácido presente en la pulpa de café. El principal componente de la fracción fenólica de los granos de café verde son los ácidos clorogénicos, alcanzando cerca del 14% (materia seca) del peso del grano (Dos Santos, 2021).

### Cuadro 3

*Acidez titulable expresada como ácido clorogénico en los extractos acuosos de pulpa seca de café*

Materia prima	Proceso	Tratamiento	Acidez titulable (mg AC/100 g Pulpa de café) $\pm$ DE	CV (%)
Extracto de Pulpa seca	Natural	T1	9.74 $\pm$ 1.53 <sup>d</sup>	15.75
Extracto de Pulpa seca	Lavado	T2	15.06 $\pm$ 1.53 <sup>c</sup>	10.19
Concentrado diluido	Lavado	T3	11.16 $\pm$ 0.92 <sup>d</sup>	8.25
Concentrado diluido	Natural	T4	13.82 $\pm$ 1.92 <sup>c</sup>	13.87
Concentrado*	Lavado	Control	20.90 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	3.88
Concentrado*	Natural	Control	23.21 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	3.50

*Nota.* DE: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. AC: ácido clorogénico. \* Infusión concentrada de pulpa de café. *Los valores <sup>a-d</sup>*

de medias seguidas de letras distintas indican diferencias entre los Tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Los resultados en el presente estudio (Cuadro 3) son superiores a los encontrados por Torres-Valenzuela et al. (2019), quienes obtuvieron 2.24 mg de ácido clorogénico por cada 100 g de pulpa de café. Lo anteriormente mencionado se puede deber a que en dicho estudio no se realizó la concentración de la pulpa, pero si una congelación lenta que pudo afectar la recuperación de estos compuestos.

#### **Análisis de Flavonoides Totales**

En el perfil de compuestos bioactivos del café, los flavonoides juegan un rol muy importante ya que las plantas sintetizan metabolitos secundarios como flavonoides y ácidos fenólicos. En el Cuadro 4, se puede observar que los Tratamientos control (concentrados de pulpa de café), presentaron los valores más altos en contenido de flavonoides totales, en un rango de 730 a 864 mg equivalentes de catequina (EC) por 100 gramos de pulpa de café, siendo el concentrado obtenido de un proceso de lavado el que presentó los valores más altos. Esto debido a que el método de concentración aumenta las características del concentrado como pH, Brix, viscosidad y densidad (Ruiz et al., 2004). Resaltando que el Tratamiento de extracto acuoso con pulpa seca y proceso lavado obtuvo una diferenciación clara frente a los demás tratamientos, lo que asegura que los subproductos resultantes del proceso de café lavado son los que poseen una mayor cantidad de flavonoides totales en comparación a los subproductos de los procesos de cafés naturales. Lo propuesto anteriormente,

se comprueba con lo plasmado en la Figura 3, mostrando niveles más altos en la pulpa seca de café, con  $314 \pm 53.81$  mg EC por 100 gramos de pulpa de café. Estos resultados son superiores a los encontrados por Pacheco et al. (2020), quienes solo reportaron 32 mg EC/100 g de pulpa de café. Los resultados reportados por Cortes et al. (2017), son de 733 mg de EC/100 g de pulpa seca, mayores a los encontrados en el presente estudio, siendo el más cercano a este resultado el control natural, con una concentración de 729 mg de EC/100 g de pulpa seca.

#### Cuadro 4

*Resultado de contenido de flavonoides totales expresados como mg equivalentes de catequina por 100 g de pulpa de café*

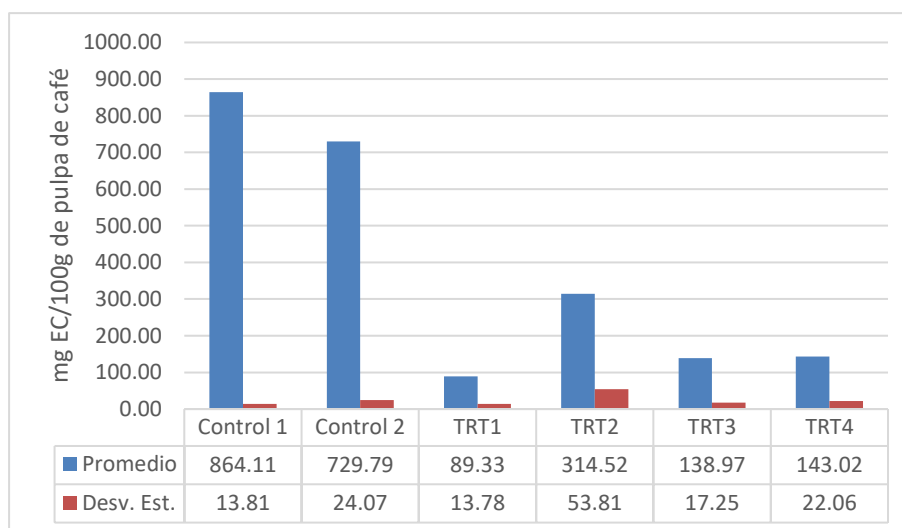
Materia Prima	Proceso	Flavonoides totales (mg EC/100 g pulpa de café) $\pm$ DE	%CV
Extracto de Pulpa seca	Natural	$89.33 \pm 13.78^e$	15.43
Extracto de Pulpa seca	Lavado	$314.52 \pm 53.81^c$	17.11
Concentrado diluido	Lavado	$138.97 \pm 17.25^d$	12.42
Concentrado diluido	Natural	$143.02 \pm 22.06^{d-e}$	15.43
Concentrado*	Lavado	$864.11 \pm 24.07^a$	1.60
Concentrado*	Natural	$729.79 \pm 13.81^b$	3.30

*Nota.* DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación. EC: equivalente de catequina. \* Infusión concentrada de pulpa de café. Los

valores <sup>a-e</sup> de medias seguidas de letras distintas indican diferencias entre los Tratamientos ( $p < 0.05$ ).

**Figura 3**

*Cuantificación de flavonoides totales mediante espectrofotómetro UV-VIS*



*Nota.* Control 1: Infusión concentrada de pulpa seca de café de proceso lavado. Control 2: Infusión concentrada de pulpa seca de café de proceso natural. TRT 1: Pulpa seca de proceso natural. TRT 2: Pulpa seca proceso lavado. TRT 3: Pulpa seca de proceso lavado. TRT 4: Pulpa seca de proceso natural. EC: equivalente de catequina.

### **Análisis de Polifenoles Totales**

Los compuestos fenólicos o polifenoles comprenden un amplio grupo de sustancias químicas presentes en el reino vegetal con diferentes estructuras químicas, dentro de este grupo de compuestos químicos, están presentes desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, hasta macromoléculas complejas como los taninos condensados y la lignina los cuales forman parte de la pulpa de café; su estructura general está conformada por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo (Mercado et al., 2013). Los compuestos fenólicos presentes en los desechos de la preparación del café, de los cuales para este experimento son de mayor relevancia los siguientes: Ácidos clorogénicos; Catequinas y Ácido gálico, este último se utilizó como estándar para la medición de polifenoles totales presentes en las muestras (Dos Santos, 2021).

La presencia de polifenoles en la pulpa seca del proceso de café lavado mostró valores de  $286.97 \pm 85.87$  mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por cada 100 g de pulpa de café, los cuales fueron más alto con relación a los demás Tratamientos evaluados, siendo que los controles

(concentrados) fueron aún más altos (Cuadro 5), ya que presentaron valores en un rango de 800 a 1200 mg EAG/100 g de concentrado de café, estos resultados son superiores a los reportados por Fierro y Morales (2018), reportando 91 mg de EAG/100 g de pulpa, esto en base húmeda. Este alto contenido de polifenoles se debe a la baja cantidad de líquidos presentes en dichos concentrados, ya que se encuentran más polifenoles en una medición de 1 mL, ya que un concentrado se obtiene cuando el soluto se halla en significativa cantidad con relación al solvente (J. Martínez y Iriondo, 2013), por lo que los compuestos están menos dispersos dentro del concentrado que de la solución. Cabe mencionar que los Tratamientos control estaban concentrados hasta 58.6 y 61.5 °Brix para los procesos de lavado y natural, respectivamente.

#### Cuadro 5

*Resultado de contenido de polifenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de pulpa de café*

Materia Prima	Proceso	Polifenoles (mg EAG/100 g pulpa de café) ± DE	%CV
Extracto de Pulpa seca	Natural	133.79 ± 11.96 <sup>d</sup>	8.94
Extracto de Pulpa seca	Lavado	286.97 ± 85.87 <sup>c</sup>	29.92
Concentrado diluido	Lavado	215.87 ± 5.92 <sup>c-d</sup>	2.74
Concentrado diluido	Natural	188.81 ± 80.11 <sup>c-d</sup>	42.43
Concentrado*	Lavado	803.37 ± 47.44 <sup>b</sup>	5.90
Concentrado*	Natural	1205.56 ± 79.68 <sup>a</sup>	6.55

*Nota.* DE: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. EAG: equivalente de ácido gálico. \* Infusión concentrada de pulpa de café. Los

*valores* <sup>a-d</sup> de medias seguidas de letras distintas indican diferencias entre los Tratamientos (p<0.05).

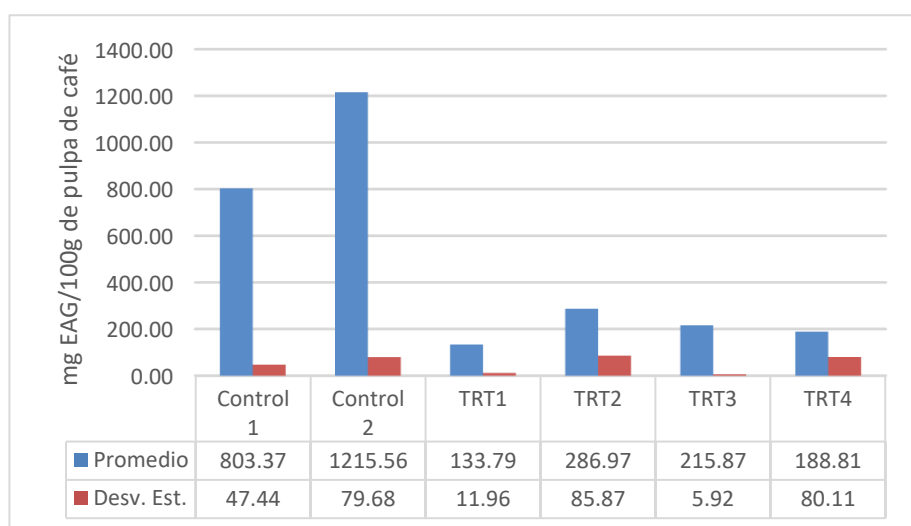
En la Figura 4 se muestra que el contenido de polifenoles totales de los controles (concentrados), fue mayor a las diluciones que fueron realizadas a partir de estas (T3 y T4), siendo los extractos acuosos de pulpa seca (T1 y T2) los que mostraron niveles más altos de compuestos bioactivos que las diluciones de los concentrados (T3 y T4). Estas cifras son menores a las reportadas por Cruzalegui et al. (2021) quien reportó 402.6 mg EAG/100 g pulpa, destacando que, junto a sus colaboradores, utilizaron un método de liofilización como preparación de la muestra y utilizaron etanol al 95% como solvente. Geremu et al. (2016) evaluaron la cantidad de polifenoles a partir de variedades de pulpa de café obtenidas mediante el uso de solventes y encontraron contenidos



mayores a los reportados en el presente estudio, utilizando 80% de metanol y resultados similares al usar etanol a 80% para la extracción. Sin embargo, en el estudio desarrollado por S. Martínez et al. (2019) reportó 455 mg GAE/100 gramos para pulpa de café, este se encuentra por arriba de los Tratamientos, al igual que los resultados obtenidos por Vidal et al. (2022), quienes obtuvieron 742 mg de EAG/100 g de pulpa, siendo solo los controles mayores a estos. Por lo que la cantidad obtenida de estos compuestos, encontrados en las muestras de este estudio, se puede deber a factores como la variedad, el solvente, procesamiento, forma de extracción e incluso la región donde fue producido el café de dicha pulpa.

**Figura 4**

*Cuantificación de polifenoles mediante espectrofotómetro UV-VIS*



*Nota.* Control 1: Infusión concentrada de pulpa seca de café de proceso lavado. Control 2: Infusión concentrada de pulpa seca de café de proceso natural. TRT 1: Pulpa seca de proceso natural. TRT 2: Pulpa seca proceso lavado. TRT 3: Pulpa seca de proceso lavado. TRT 4: Pulpa seca de proceso natural. EAG: equivalente de Ácido Gálico.

Luego de realizar los análisis de correlación entre los contenidos de flavonoides y polifenoles totales presentes en los diferentes extractos utilizados (Cuadro 6), se encontró que el nivel de acidez está estrechamente relacionado con los contenidos de dichos compuestos en la pulpa seca del café, teniendo estas una correlación altamente negativa (-0.72604 para flavonoides y -0.68400 para polifenoles) viendo con esto que el pH es una variable que se debe tomar en consideración para lograr

altos contenidos en cuanto al contenido de los compuestos bioactivos. Esto concuerda con Rovira (2016), que indica que el pH es una variable influyente en la recuperación de compuestos fenólicos. Puesto que a medida que disminuye el pH, aumenta la cantidad de compuestos bioactivos dentro de las muestras.

### Cuadro 6

*Correlación entre pH y contenido de compuestos bioactivos en los extractos acuosos de pulpa de café*

Parámetro	Flavonoides totales	Polifenoles totales
pH	-0.72604	-0.68400
p-value	0.0006	0.0017

*Nota.* p-value se refiere a la probabilidad de que ocurra un evento al azar,  $p < 0.05$ .

### Evaluación de Actividad Antimicrobiana

Analizando el Cuadro 7 se puede notar que el Tratamiento de extracto acuoso con pulpa seca y lavado obtuvo la media de halo de inhibición más alta de todo el experimento, con 9.68 mm, siendo este mismo el que obtuvo la mayor cantidad de compuestos bioactivos entre los Tratamientos evaluados. Esto concuerda con los datos obtenidos en el estudio de J. Martínez y Iriondo (2013), donde el Tratamiento con mayor cantidad de compuestos bioactivos fue el que obtuvo mayor porcentaje de inhibición en las bacterias gram positivas *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, y las bacterias gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Diversos estudios realizados en los cuales analizan la capacidad inhibitoria de la pulpa de café en base líquida concluyen que los microorganismos gram positivo son más susceptibles ante estos extractos, a diferencia de los microorganismos gram negativo que no presentaron este grado de susceptibilidad (Chaves et al., 2023). El efecto de inhibición puede ser consecuencia de la conformación estructural de la pared celular de las bacterias, ya que las gram negativas tienen la pared celular rodeada con una membrana externa que impide el paso de compuestos hidrofóbicos (Chalalai et al., 2015). Los microorganismos evaluados en el presente estudio fueron gram negativos, y se encontró mayor susceptibilidad por parte de *Salmonella Typhimurium*. Cabe mencionar que, aunque son gram negativos, ambos serotipos de *Salmonella* fueron susceptibles en medidas diferentes (9.68

$\pm 1.54$  mm para Typhimurium y  $9.01 \pm 1.54$  para Poona). Por otro lado, los resultados para *E. coli*, discrepan de los encontrados anteriormente por Pushpa y Naidu (2012), en los cuales se reportan que no hay inhibición. El método de acción de los antimicrobianos de origen natural no está del todo claro, se conoce que los agentes antimicrobianos de origen natural pueden afectar la síntesis de ergosterol, afectando la membrana citoplasmática, crean canales o pequeños orificios en la membrana por los cuales otros compuestos pueden atravesar y afectar las mitocondrias, el núcleo (los ácidos nucleicos), enzimas, las proteínas transmembranales, estrés oxidativo, la permeabilidad y, en última instancia, destruyendo la integridad celular (Grande et al., 2020). Sabiendo esto, es posible que la inhibición que presentaron los Tratamientos se deba a otro mecanismo de acción de los polifenoles y no solo por su capacidad antioxidante. Los ácidos fenólicos y los fenoles simples pueden variar, desde su anillo de fenol simple, tener una única sustitución de ácidos como el cinámico y cafeico, y hasta tener múltiples sustituciones e hidroxilaciones. Existe evidencia de que el sitio y el grado de hidroxilación se correlacionan con la toxicidad del metabolito secundario. El metabolito parece ser más inhibidor cuanto más oxidada está la estructura (Cowan, 1999). Así mismo menciona que los mecanismos de inhibición de los fenólicos incluyen enzimas inhibidoras. Se sugiere que esta inhibición se produce mediante reacciones con grupos sulfhídricos de las proteínas.

## Cuadro 7

*Análisis de sensibilidad de discos de E. coli<sup>~</sup>, Salmonella Typhimurium y Salmonella Poona (mm)*

*frente a extractos acuosos de pulpa de café*

Materia Prima	Proceso	<i>E. coli</i> <sup>*~</sup> $\pm$ DE	<i>Salmonella</i> Typhimurium <sup>*~</sup> $\pm$ DE	<i>Salmonella</i> Poona <sup>*~</sup> $\pm$ DE	CV (%)
Extracto de Pulpa seca	Natural	$4.90 \pm 4.24^a$	$5.56 \pm 4.82^a$	$8.01 \pm 0.58^a$	26.62
Extracto de Pulpa seca	Lavado	$6.23 \pm 5.49^a$	$9.68 \pm 1.54^a$	$9.01 \pm 1.54^a$	22.02
Concentrado diluido	Lavado	$3.45 \pm 5.98^a$	$9.01 \pm 1.54^a$	$0.00 \pm 0.00^b$	109.45
Concentrado diluido	Natural	$0.00 \pm 0.00^a$	$6.23 \pm 5.49^a$	$0.00 \pm 0.00^b$	173.21
Concentrado <sup>^</sup>	Lavado	$5.23 \pm 4.56^a$	$2.45 \pm 5.49^a$	$2.45 \pm 4.24^b$	47.53
Concentrado <sup>^</sup>	Natural	$4.90 \pm 4.24^a$	$2.45 \pm 4.24^a$	$4.90 \pm 4.24^{ab}$	34.64
Etanol	95%	$2.45 \pm 4.24^a$	$5.23 \pm 4.24^a$	$4.90 \pm 4.24^{ab}$	36.22

Nota. DE: Desviación estándar. CV: coeficiente de variación en porcentaje. \*Resultados expresados en mm. ~ Cepa ATCC 32219. ^Infusión

concentrada de pulpa de café. Los valores <sup>a-b</sup> de medias seguidas de letras distintas indican diferencias entre los Tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Pushpa y Naidu (2012) mencionan que la capacidad antioxidante puede estar estrechamente relacionada con la cantidad de estos compuestos presentes. Sin embargo, en este estudio no se encontró una correlación significativa ( $p < 0.05$ ) entre ninguna de las variables (Cuadro 8), lo cual se debe a que la mayoría de los métodos *in vitro* han demostrado que los polifenoles son efectivos como antioxidantes, sin embargo, los estudios *in vivo* arrojan resultados no concluyentes; esto debido a que la forma de actuar de los polifenoles presentes en la pulpa seca puede cambiar su forma de actuar si sufre algún cambio estructural (Mercado et al., 2013).

El Cuadro 8 muestra que no hubo una probabilidad significativa entre los microorganismos y los contenidos de compuestos bioactivos. De igual manera, para la variable de pH, siendo que no hay una influencia de este en la inhibición de microorganismos.

### Cuadro 8

*Probabilidades para la interacción de la acidez titulable, polifenoles totales, flavonoides totales, pH y °Brix sobre la sensibilidad de Salmonella Typhimurium, Salmonella Poona y Escherichia Coli*

Microorganismo	Acidez titulable mg AC/100g pulpa	Polifenoles totales mg EC/100 g pulpa	Flavonoides totales mg EAG/100 g pulpa	pH	Brix
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-0.1358	-0.0078	-0.0662	0.2378	-0.1358
<i>p-value</i>	0.6034	0.9770	0.8007	0.3580	0.6032
<i>Salmonella Poona</i>	-0.2828	-0.4494	-0.4131	0.0827	-0.5128
<i>p-value</i>	0.2713	0.0808	0.0993	0.7522	0.0353
<i>Escherichia coli</i>	0.15159	0.18035	0.36567	-0.09875	0.2763
<i>p-value</i>	0.5614	0.5039	0.1489	0.7061	0.283

Nota. AC: ácido clorogénico. EC: equivalente de catequina. EAG: equivalente de ácido gálico. p-value se refiere a la probabilidad de que ocurra un evento al azar ( $p < 0.05$ ).

### Conclusiones

Se extrajeron los compuestos bioactivos de la pulpa de café y se determinó que existe una diferencia en su contenido según el tipo de proceso.

Los concentrados puros presentaron el mayor contenido de flavonoides y polifenoles totales, destacando que los Tratamientos de pulpa seca de proceso lavado sobresalieron en cuanto a contenido de flavonoides.

Se encontró que los microorganismos estudiados fueron susceptibles a los extractos acuosos de pulpa de café, siendo el más afectado *Salmonella Typhimurium* y el menos afectado *E. coli*.

### **Recomendaciones**

Realizar un análisis de capacidad antioxidante a las soluciones para determinar la correlación de dicha característica, con la capacidad inhibitoria frente a los microorganismos.

Realizar el análisis de inhibición por medio de una prueba de micro dilución en caldo a soluciones con concentraciones diferentes.

Realizar un análisis de HPLC para la identificación de todos los componentes presentes en las soluciones.

Cuantificar y determinar el componente de mayor proporción en las soluciones para hacer la correlación de cada compuesto con la capacidad inhibitoria.

## Referencias

- AOAC (Ed.). (2000). *AOAC Official Methods of analysis*. AOAC Official Method 942.15 Acidity (Titrable) of Fruit Products. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25528/7/ANEXO%205%20942.15.pdf>
- BD. (2005). *Patrón de turbidez BBL preparado McFarland Turbidity Standard No. 0.5*. <https://studylib.es/doc/5586880/patr%C3%B3n-de-turbidez-bbl-preparado>
- Bernal, M. y Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3-4), 112. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž. y Bren, U. (2016). *Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects*.
- Bustamante, Y. (2022). *Informe Estadístico IHCAFÉ 2020-2021*. <https://www.ihcafe.hn/wp-content/uploads/2022/02/Resumen-Informe-2020-2021.pdf>
- Castelló, M., Fito, P. y Betoret, N. (2020). *Fundamentos de la Extracción Sólido-Líquido*. Universitat Politècnica de València, España. [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/147097/Castell%C3%B3-Fito%3BSegu%C3%AD%20-%20Fundamentos%20de%20la%20Extracci%C3%B3n%20S%C3%B3lido-L%C3%ADquido.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20operaci%C3%B3n%20de%20extracci%C3%B3n%20s%C3%B3lido,l%C3%ADquido,l%C3%ADquido%2C%20disolvente%20\(E0\)](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/147097/Castell%C3%B3-Fito%3BSegu%C3%AD%20-%20Fundamentos%20de%20la%20Extracci%C3%B3n%20S%C3%B3lido-L%C3%ADquido.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20operaci%C3%B3n%20de%20extracci%C3%B3n%20s%C3%B3lido,l%C3%ADquido,l%C3%ADquido%2C%20disolvente%20(E0))
- Chalalai, J., Sarawut, C. y Punbusayakul, N. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvents extracts of Arabica coffee pulp. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 19(5), 224–227. <https://scindeks.ceon.rs/article.aspx?artid=1821-44871505224C&lang=en>
- Chaves, C., Rodríguez, C., Arias, M. y Esquivel, P. (2023). Antimicrobial activities of phenolic extracts of coffee mucilage. *NFS Journal*, 31, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2023.03.005>
- Cortes, S., Ortiz, A., Stella, L. y Aristizabal. (2017). *Determinación de antioxidante en subproductos de café producido y comercializado en Risaralda (Colombia)*. Universidad tecnológica de Pereira. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/1801b523-8f5d-4272-8170-ee457d9920e6/content>
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>
- Cruzalegui, R., Güivin, O., Fernández, A. y Cruz, R. (2021). *Caracterización de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de pulpa de café (Coffea arabica L.) deshidratada de tres fincas cafeteras de la región Amazonas (Perú)*. Instituto de Investigación, Innovación y Desarrollo para el Sector Agrario y Agroindustrial de la Región Amazonas (IIDAA). [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642021000500157](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642021000500157)
- Dos Santos, L. (2021). *Extracción de ácido clorogénico y cafeína a partir de posos de café*. Escola Politecnica Superiors, España. <https://repositori.udl.cat/server/api/core/bitstreams/9273bb39-8b34-4f1b-b4e5-f7532309756d/content>

- Fierro, N. y Morales, V. (2018). *Caracterización Química y Nutricional de la Pulpa de Café (Coffea arabica L.)*.  
[https://www.researchgate.net/publication/326246134\\_CHARACTERIZACION\\_QUIMICA\\_Y\\_NUTRIMENTAL\\_DE\\_LA\\_PULPA\\_DE\\_CAFE\\_Coffea\\_arabica\\_L](https://www.researchgate.net/publication/326246134_CHARACTERIZACION_QUIMICA_Y_NUTRIMENTAL_DE_LA_PULPA_DE_CAFE_Coffea_arabica_L)
- Gacto, M. (2019). *Métodos de Laboratorio para las Pruebas de Sensibilidad de las Bacterias Frente a los Antimicrobianos*. Manual Terrestre de la OIE.  
[https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.01.01\\_M%C3%A9todos\\_laboratorio.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.01_M%C3%A9todos_laboratorio.pdf)
- García, E., Fernández, I. y Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Universitat Politècnica de València.  
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1#:~:text=El%20ensayo%20Folin%2DCiocalteu%20se,determinada%20espectrofotom%C3%A9tricamente%20a%20765%20nm>
- Geremu, M., Tola, Y. B. y Sualeh, A. (2016). Extraction and determination of total polyphenols and antioxidant capacity of red coffee (Coffea arabica L.) pulp of wet processing plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0077-1>
- Grande, C., Araujo, L., Flórez, E. y Aranaga, C. (2020). *Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (Rubus glaucus Benth)*.
- ICONTEC. (2004). *Norma Técnica Colombiana: Café Tostado, en Grano o Molido. Determinación de la Acidez Titulable*.
- Jung, Y.-G., Yun, Y.-R., Song, S.-H. y Park, W. (2018). Marker Pen Device with Concentration Gradient Nib for Antibiotic Susceptibility Testing. *Journal of Korean Medical Science*, 33(33), e224. <https://doi.org/10.3346/jkms.2018.33.e224>
- Kalembe, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- López, T., Prado, A., Nevárez, G., Contreras, J., Rodríguez, R [R.] y Aguilar, C [C.] (2013). Incremento de la capacidad antioxidante de extractos de pulpa de café por fermentación láctica en medio sólido. *CyTA - Journal of Food*, 11(4), 359–365. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.773563>
- Martínez, J. y Iriondo, C. (2013). *Disoluciones: Características generales. Tipos de disoluciones. Formas de expresar la concentración. Factores que influyen en la solubilidad. Propiedades coligativas*. [https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/43171/mod\\_resource/content/1/TEMA\\_3\\_v5.pdf](https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/43171/mod_resource/content/1/TEMA_3_v5.pdf)
- Martínez, S., Hernández, F., Aguilar, C [Cristóbal] y Rodríguez, R [Raúl] (2019). Extractos de pulpa de café: Una revisión sobre antioxidantes polifenólicos y su actividad antimicrobiana. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*(77), 73–79. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7163188>
- Mercado, G., Carrillo, L., Wall, A., López, J. y Alvarez, E. (2013). *Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México* [Polyphenolic compounds and antioxidant capacity of typically consumed species in Mexico]. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/6298.pdf>

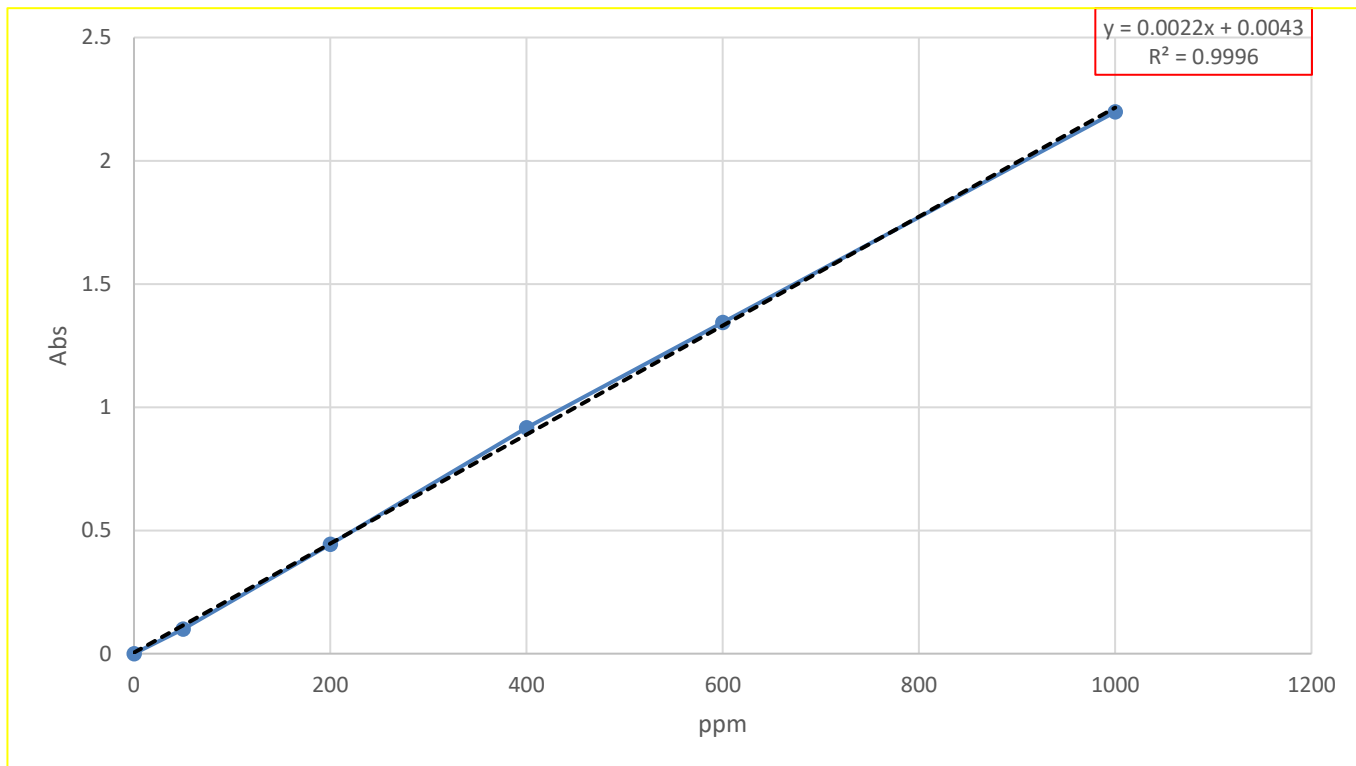


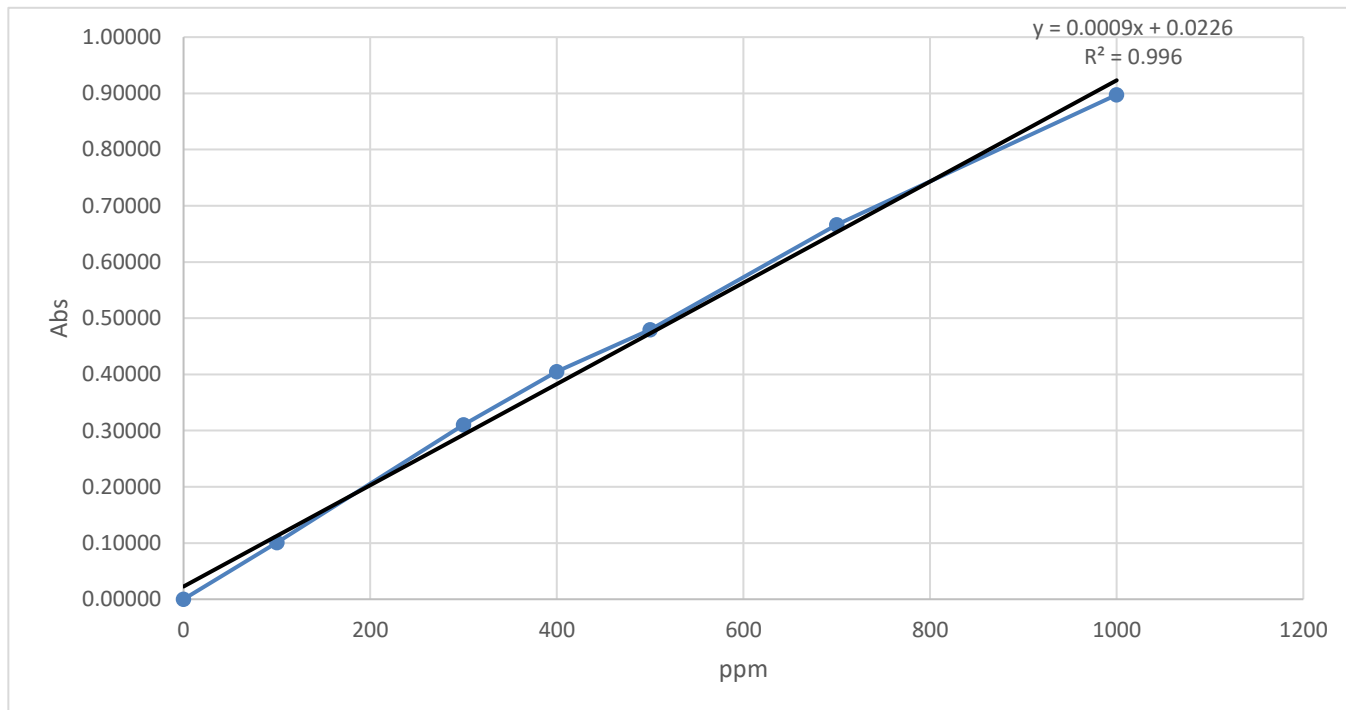
- Pacheco, F., Torres, R., Arvelo, T. y Velasquez, I. (2020). *Vista de Variación de la actividad antioxidante por efecto del tostado en granos de café (Coffea arabica), estado Miranda, Venezuela*. <https://revistas.intec.edu.do/index.php/cienacli/article/view/2010/2452>
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L. y Bravo, J. A. (2014). *Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos*. *Revista Boliviana de Química*. <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf>
- Pérez, L., Chávez, K., Medina, L. y Gámez, N. (2015). *Compuestos Fenólicos, Melanoidinas y Actividad Antioxidante de Café Verde y Procesado de las Especies (Coffea arabica y Coffea canephora)*. *BIOtecnia*, 15(1), 51. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i1.136>
- Picazo, J. J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Pinelo, M., Arnous, A. y Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579–590. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.05.003>
- Pushpa, S. M. y Naidu, M. (2012). Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food and Bioprocess Technology*. *Food Bioprocess Technology*, 5(3), 897–903. <https://ir.cftri.res.in/9807/>
- Rovira, J. (2016). La acidez en el café, percepción en la boca. *FÓRUM CAFÉ*, 68, 24–28. <https://online.pubhtml5.com/bxcm/brjm/#p=1>
- Ruiz, D., Riaño, C. y Orozco, L. (2004). *Concentración de Extractos de Café Tratados Enzimáticamente*. *Cenicafé*. <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc055%2803%29213-220.pdf>
- Tobo. (2009). *Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Acuosa de Pentacalia ledifolia y Pentacalia vaccinioides (Fam. Asteraceae) Sobre Sepas de Listeria monocytogenes, Pseudomonas fluorescens y Salmonella Typhimurium [Trabajo de Grado]*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8454/tesis421.pdf?sequence=1>
- Torres-Valenzuela, L. S., Martínez, K. G., Serna-Jimenez, J. A. y Hernández, M. C. (2019). Secado de Pulpa de Café: Condiciones de Proceso, Modelación Matemática y Efecto sobre Propiedades Físicoquímicas. *Información Tecnológica*, 30(2), 189–200. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000200189>
- Vidal, E., Sierra, R. y Cruz, L. (2022). *Recuperación de compuestos fenólicos de la*. Universidad de los Andes. <https://www.semanticscholar.org/paper/Recuperaci%C3%B3n-de-compuestos-fen%C3%B3licos-de-la-pulpa-de-Vidal-Ram%C3%ADrez/77439c3f96e0df2a81d8adf62cc46c37be488330>
- Zhishen, J., Mengcheng, T. y Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

## Anexos

## Anexo A

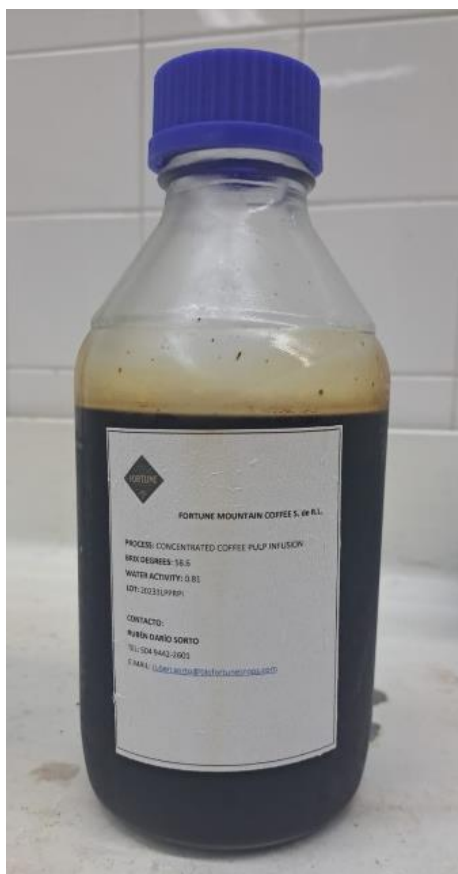
## Curva estándar de catequina



**Anexo B***Curva estándar de ácido gálico*

Anexo C

Materia prima del experimento

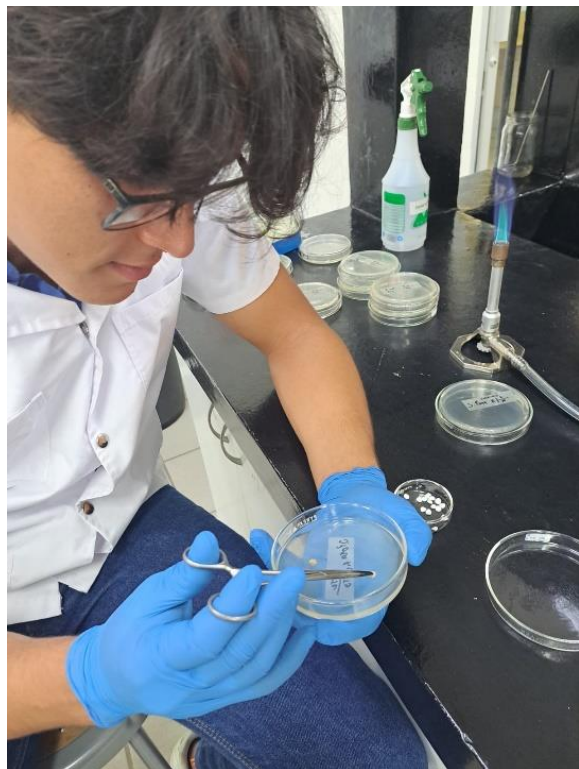
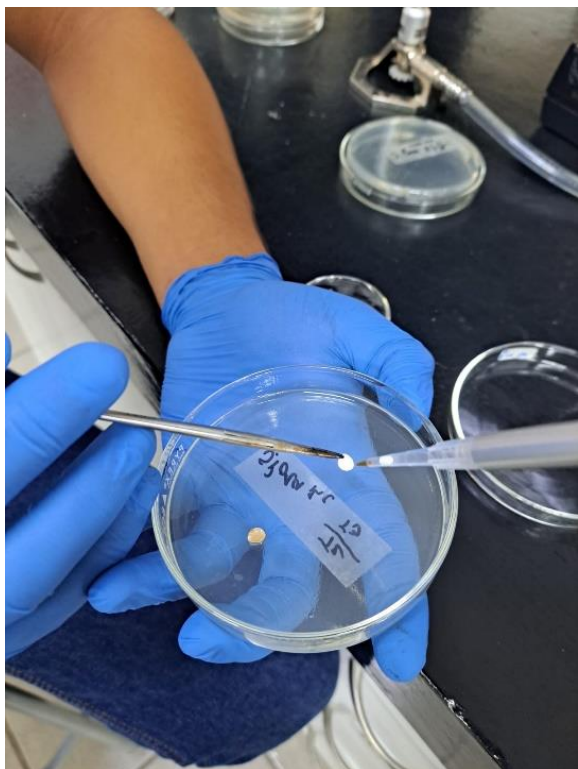


**Anexo D***Dilución Sólido-Líquido*



Anexo E

Realización de antibiogramas



## Anexo F

## Resultados de antibiogramas

