

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN “*IN VITRO*” DEL EFECTO DE UN EXTRACTO
DERIVADO DE MUCÍLAGO DE CAFÉ, SOBRE MICROORGANISMOS
PATOGENOS, DE DETERIORO Y ASOCIADOS A LA FLORA
INTESTINAL DEL SER HUMANO

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios
de Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar al grado y título de
Maestría Académica en Ciencia de Alimentos

EVELYN CAROLINA CHAVES ULATE

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

DEDICATORIA

A Dios y a María Auxiliadora que durante toda mi vida han estado conmigo, me han dado salud, trabajo y me han concedido los anhelos de mi corazón.

A mis papas Vilma y Jorge que han luchado con uñas y dientes para darme siempre lo mejor. Por su ejemplo, dedicación y cariño.

A Víctor quien más que mi esposo a lo largo de todo este tiempo se ha convertido en MI AMIGO incondicional, mi apoyo y mi baluarte para todas las luchas que hemos sobrellevado y las que vendrán.

A Vicky y a Enrique de quienes me viene la fuerza para culminar este proyecto

A mis hermanas, sobrino y cuñados por siempre apoyarme.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a la Dra. Patricia Esquivel Rodríguez, directora de esta tesis, por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por su tiempo, paciencia, su buena disposición y sus enseñanzas.

Al Dr. César Rodríguez Sánchez que siempre me apoyó y escuchó. Sus ideas y consejos fueron de gran ayuda en los momentos más duros del proceso. Le agradezco profundamente toda su ayuda en la minuciosa revisión y aporte de ideas para este documento.

A la Dra. María Laura Arias Echandi, quien a pesar de sus múltiples ocupaciones siempre tuvo tiempo para aportar en esta tesis.

A la Dra. María Lourdes Pineda Castro por su apoyo durante este proceso.

A Giovanni González “Giova” que siempre tuvo gran disposición para ayudarme y facilitarme el trabajo en el laboratorio.

A Luis Morales “Luisito” por su apoyo y por hacerme reír.

A Juan Carlos Monge por siempre ayudarme con todos los trámites administrativos.

A todos los docentes, investigadores y asistentes de la escuela de Tecnología de Alimentos y de la Facultad de Microbiología que de una u otra forma hicieron posible que esta tesis se llevara a cabo.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos”

Dra. María Lourdes Pineda Castro, M. Sc.
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado

Ph.D. Patricia Esquivel Rodríguez
Profesora Guía

M.Sc. María Laura Arias Echandi
Lectora

Ph.D. César Rodríguez Sánchez
Lector

M.Sc. Lea Wexler Goering
Representante de la directora del
Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos

Evelyn Carolina Chaves Ulate
Sustentante

Tabla de Contenido

Dedicatoria.....	II
Agradecimientos.....	III
Hoja de aprobación	IV
Tabla de Contenidos.....	V
Resumen.....	VI
Índice de Cuadros.....	VII
Índice de Figuras.....	VIII
Capítulo 1	
Introducción	1
Capítulo 2	
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
Hipótesis	6
Capítulo 3	
Marco teórico.....	7
El café, su procesamiento y la generación de subproductos.....	8
Compuestos fenólicos y subproductos del café.....	13
Efecto antimicrobiano de los polifenoles.....	19
Capítulo 4	
Materiales y métodos.....	23
Mucílago de café.....	23
Microorganismos utilizados.....	24
Medios de Cultivo.....	25
Pruebas preliminares.....	25
Obtención del extracto a partir de mucílago.....	27
Cuantificación de compuestos fenólicos presentes en el extracto para identificar sus posibles sustancias activas. Diseño experimental.....	28
Análisis estadístico	30
Evaluación del efecto in vitro de extractos de mucílago de café, sobre el crecimiento de bacterias.....	30
Diseño experimental.....	32
Cuantificación del efecto inhibitorio.....	35
Análisis estadístico.....	36
Capítulo 5	
Resultados.....	38
Capítulo 6	
Discusión.....	45
Capítulo 7	
Conclusiones y recomendaciones.....	53
Referencias.....	57
Anexo 1 Resultados Estadísticos.....	69

Resumen

El metabolismo microbiano es la principal causa de deterioro de los alimentos. El ser humano ha buscado diferentes formas de afrontar este importante problema. Estas estrategias, en ocasiones han generado problemas ecológicos, como la resistencia antimicrobiana, y problemas de salud, como el desbalance hormonal, toxicidad o procesos cancerígenos. Por esta razón, la comunidad científica se ha interesado por prospectar compuestos naturales con capacidad antimicrobiana; no obstante, en este contexto, los compuestos fenólicos presentes en los subproductos del grano del café (pergamino, pulpa, mucílago, “silver skin”) han sido poco explorados. De igual manera, existen pocos datos sobre el efecto selectivo de estos compuestos sobre la biota intestinal del ser humano.

El mucílago de café es uno de los subproductos más abundantes obtenidos durante el procesamiento húmedo del grano de café. Está compuesto básicamente por agua, azúcares, pectinas y ácidos orgánicos; sobre su contenido de polifenoles se encuentra poco o nada en la literatura. Por tanto, el interés de esta investigación giró en torno a caracterizar un extracto de mucílago de café cuantificando, mediante HPLC, los ácidos clorogénicos presentes en este extracto y evaluar el efecto “in vitro” del mismo sobre bacterias potencialmente patógenas y/o asociadas con el deterioro de los alimentos y sobre bacterias de la microbiota intestinal del ser humano.

Se determinó la presencia de ácidos clorogénicos en un rango de 2.67 a 4.76 mg/ml de extracto, así como la presencia de cafeína con valores de 1.24 y hasta 6.48 mg/ml de extracto. Se pudo concluir que el extracto rico en polifenoles obtenido a partir de mucílago de café tiene la capacidad de incidir en el crecimiento bacteriano por un mecanismo dosis-dependiente. Este efecto es más evidente en las bacterias Gram-positivas, no obstante, es selectivo, ya que no todos los microorganismos Gram-positivos usados en el estudio fueron afectados de igual forma. Del grupo de bacterias patógenas o asociadas a deterioro, *B. cereus* resultó ser el más sensible, mientras que las asociadas a la biota intestinal no tuvieron mayor afectación. Al mostrar un carácter selectivo de inhibición, este extracto podría ser de utilidad en sistemas alimentarios ya sea como biopreservante añadido propiamente al alimento o como conservante, incorporándolo en diversos materiales utilizados para la producción de empaques inteligentes, claro está que deben realizarse pruebas de toxicidad y sensoriales para determinar su utilidad

Índice de Cuadros

Cuadro	Pg
Cuadro 1. Altitud, coordenadas de ubicación de los beneficios y características sensoriales de la taza de café en las regiones cafetaleras de Costa Rica	24
Cuadro 2. Tiempos de retención, espectros ultravioleta/visible y datos del espectro de masas de un extracto de mucílago de café	29
Cuadro 3. Concentraciones finales de extracto de mucílago añadidas a los platos Petri	30
Cuadro 4. Tratamientos a aplicar para evaluar el efecto del extracto de mucílago sobre el crecimiento de microorganismos de deterioro, patógenos y asociados a la flora intestinal del ser humano.	34
Cuadro 5. Identificación y cuantificación de ácidos clorogénicos y cafeína presentes en el extracto de mucílago de café.	39
Cuadro 6. Comparación del efecto de diferentes concentraciones de extracto de mucílago de café sobre diferentes concentraciones de bacterias PD.	41
Cuadro 7. Comparación del efecto de diferentes concentraciones de extracto de mucílago de café sobre diferentes concentraciones de bacterias ABI	42
Cuadro 8. Comparación del efecto del extracto de mucílago (61.8 mg/ml) y de cafeína (7.02 mg/ml) sobre el crecimiento de diversas bacterias	44

Índice de Figuras

Figura	Pg
Figura 1. Estructura del fruto de café	1
Figura 2. Esquema beneficiado de café. Proceso húmedo	10
Figura 3. Clasificación de compuestos polifenólicos y ejemplos de sus estructuras	14
Figura 4. Estructura del ácido 5-O-cafeoil-ácido quínico (ácido clorogénico)	15
Figura 5. Estructura básica de melanoidina	23
Figura 6. Esquema general del procedimiento a seguir para determinar el efecto in vitro sobre el crecimiento de 12 especies bacterianas de extractos de mucílago	27
Figura 7. Esquema de procedimiento a seguir para evaluar el efecto de los extractos fenólicos sobre diversas bacterias	32
Figura 8. Procedimiento seguido para cuantificación de la inhibición	37
Figura 9. Cromatograma obtenido por HPLC/PDA, de extracto de mucílago de café	38
Figura 10. Inhibición de crecimiento <i>B. cereus</i> en presencia de extracto de mucílago.	40
Figura 11. Disminución de una población de <i>B. cereus</i> en presencia de un extracto de mucílago de café que contiene 0.8g/ml)	45
Figura 12. Estructura de la pared bacteriana	47



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, _____, con cédula de identidad _____, en mi condición de autor del TFG titulado _____

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. **SI** **NO** *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Introducción

El fruto del café se obtiene del cafeto. Este es un arbusto originario de África que pertenece al género *Coffea*. Su fruto es fibroso y posee dos semillas en su interior. Externamente el grano está cubierto por una piel suave o pericarpio de color verde que al madurar se torna rojo, amarillo o naranja (Alves, *et al.*, 2017). Luego del pericarpio o cáscara se encuentra la pulpa o mesocarpio externo, de color amarillento, translúcido y de sabor dulce. Posteriormente se encuentra el mucílago que es una capa viscosa translúcida, altamente hidratada, a la que también se le llama capa de pectina. Luego se ubica un fibroso y fuerte endocarpio amarillento que cubre ambas semillas y las separa una de otra, éste recibe el nombre de pergamino, y finalmente está la capa conocida como “silver skin” que recubre toda la semilla (Figura 1) (Esquivel & Jiménez, 2012).

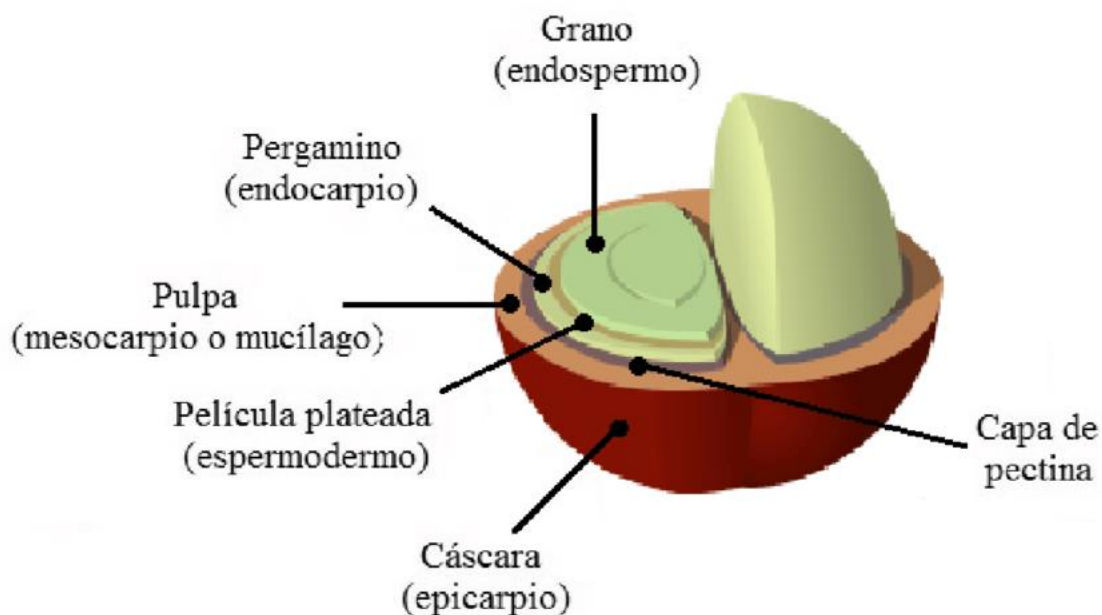


Figura 1: Estructura del fruto de café. Tomado de Guardia, 2012

Del café se obtiene una de las bebidas más populares en todo el mundo (Mendes dos Santos *et al.*, 2021). La proyección de producción mundial para la cosecha 2019-2020 se estimó en 167 179 millones de sacos de 60 kg, mientras que el consumo en 167.59 millones de sacos (Instituto del Café de Costa Rica, 2020). A nivel de los mercados mundiales, es el segundo producto de importancia, luego del petróleo (Brigitta *et al.*, 2016; Esquivel y Jimenez, 2012; Naranjo *et al.*, 2011), generando una ganancia cercana a los diez billones de dólares por año (Butt y Sultan, 2011).

Las especies *Coffea arabica* (Arábica) y *C. canephora* (Robusta) son las más utilizadas para para la obtención de la bebida de café (Alves *et al.*, 2017). La especie arábica posee un aroma más fino y menor cantidad de cafeína, por lo que se considera una taza de mejor calidad (Ludwig *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2011) y representa cerca del 70% del café comercializado a nivel mundial. El café robusta, por su parte, se utiliza más para la producción de café instantáneo y expreso (Crozier *et al.*, 2012). Independientemente de la variedad usada, se sabe que la bebida de café es muy compleja y contienen más de 1000 compuestos que en conjunto son responsables del aroma y sabor de la misma (Yeretzian *et al.*, 2010). La cafeína y los ácidos clorogénicos son algunos de los compuestos que más interés han generado en la comunidad científica, debido a sus efectos en la salud humana. No obstante, la composición química de esta bebida depende de muchos factores que van desde la calidad del grano, el tratamiento post cosecha hasta el método de extracción que se utilice (Angeloni *et al.*, 2019). Un estudio realizado por un grupo de investigadores de la Universidad de Glasgow en el año 2011 analizó, mediante HPLC, el contenido de cafeína y ácidos clorogénicos de 20 diferentes marcas comerciales de café expreso. Los investigadores, encontraron que los niveles de ácidos clorogénicos tenían un rango muy

amplio que iba de 24 a 422 mg de ácido clorogénico por porción, con una media de 145 mg de ácidos clorogénicos por porción. Esto solo para el café tipo expreso (Crozier *et al.*, 2012). Angeloni *et al.* (2019), reportan concentraciones de 17 mg/ml para café expreso y 2.43 mg/ml para el café elaborado en prensa francesa. Ludwin *et al.* (2014) analizaron 104 diferentes café expreso (Italiano, Español, Escocés), 20 diferentes cafés tipo capuchino y 8 diferentes tipos de café instantáneo. Luego de los análisis reportaron un rango de ácidos clorogénicos de 6 a 188 mg por porción. Este grupo explica que esa variabilidad en el contenido de ácidos clorogénicos se debe entre otras cosas al efecto del tostado del grano, ya que determinaron que el grano de café sin tostar posee cerca de 41mg/g de ácidos clorogénicos, este contenido disminuye a 19 mg/g con un tostado suave (197°C), a 10 mg/g con un proceso de tostado medio (211°C) y a 5 mg/g en un tostado oscuro (219°C).

Diversos investigadores han atribuido al consumo de la bebida derivada de este grano efectos beneficiosos para el ser humano (Mithul Aravind *et al.*, 2021; Gokcen & Sanlier, 2019; Hu *et al.*, 2019; Martini *et al.*, 2016; Butt y Sultan, 2011), que van desde propiedades antioxidantes hasta actividad antimicrobiana (Khochapong *et al.*, 2021; Siqueira-Palmeri *et al.*, 2018; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013b). Algunos trabajos describen la capacidad inhibitoria del café, así como de componentes o subproductos de la bebida de café, sobre bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* (Duangjai *et al.*, 2016; Guil-Guerrero *et al.*, 2016; Gyawali e Ibrahim, 2012; Martínez-Tomé *et al.*, 2011; Daglia *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2006). Con base en pruebas de difusión en agar, y determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de patrones de ácidos clorogénicos, extractos de silverskin, pulpa de

café y café molido, algunas de estas investigaciones han sugerido que los polifenoles presentes en el café y sus subproductos son los responsables de la actividad antibacteriana observada (Duangjai *et al.*, 2016; Guil-Guerrero *et al.*, 2016; Lou *et al.*, 2011). Existe suficiente evidencia relacionada con la interacción de compuestos fenólicos de diferentes orígenes y patógenos como *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans* o *L. monocytogenes*; no obstante, la descripción de la actividad de polifenoles sobre bacterias de deterioro asociadas a los alimentos es pobre.

El metabolismo microbiano es la principal causa de deterioro de los alimentos, provocando que estos pierdan su calidad e inocuidad y generando pérdidas millonarias alrededor del mundo (Zeb, 2020; Martínez-Tomé *et al.*, 2011). Por esa razón, la humanidad, desde el inicio de los tiempos, ha buscado maneras de preservar los alimentos, las cuales van desde el rudimentario salado hasta el uso de sustancias antimicrobianas. Estas estrategias, en ocasiones, han generado problemas ecológicos, como la resistencia antimicrobiana, y problemas de salud, como desbalance hormonal, toxicidad o procesos cancerígenos (Martínez-Tomé *et al.*, 2011). En este contexto, el uso de sustancias naturales para evitar el deterioro microbiano de los alimentos es entonces una opción bien valorada. Hay estudios que describen el efecto de especies y sus aceites esenciales en el control de microorganismos de deterioro (Dutra da Silva *et al.*, 2021); sin embargo, esto es algo que poco se ha explorado con los compuestos fenólicos presentes en los subproductos del grano del café. El estudio de la utilidad de estas matrices como fuente de compuestos fenólicos que puedan utilizarse para el control de microorganismos de deterioro de alimentos permitiría revalorizar estos residuos y al mismo tiempo ayudaría a disminuir la potencial contaminación que pueden producir en el medio ambiente.

De igual manera, existen pocos antecedentes sobre el efecto selectivo de los ácidos clorogénicos, y otros compuestos fenólicos presentes en los subproductos generados a partir del procesamiento del grano de café, sobre bacterias de la biota intestinal del ser humano (Mithul Aravind *et al.*, 2021; Gemechu, 2020; Chan, *et al.*, 2018; McCarthy & O’Gara, 2015; Nakayama & Oishi, 2013; Gyawali e Ibrahim, 2012). En los últimos años se ha sugerido que los compuestos fenólicos tienen potencial prebiótico (Mithul Aravind *et al.*, 2021; Tomás Barberán & Espín, 2019; Loo *et al.*, 2020). Existen estudios que valoran el efecto de la bebida de café en este contexto (Mithul Aravind *et al.*, 2021; Loo *et al.*, 2020; Clifford *et al.*, 2020); sin embargo, es hasta hace poco tiempo que se piensa en los subproductos como fuente de polifenoles, como es el caso del silver skin o el desecho de café molido que queda luego de hacer la bebida “spent coffee” (Muthy & Naidu 2012; Esquivel & Jiménez, 2012).

Por tanto, estudiar el potencial de los subproductos del café como fuente de compuestos fenólicos permitiría obtener mayores beneficios de la fruta y darle aprovechamiento a material que de otra manera sería subutilizado. Las posibilidades de aplicaciones biotecnológicas de los polifenoles son muy variadas e incluyen opciones en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Mendes dos Santos *et al.*, 2021).

Objetivo general

Evaluar el efecto *in vitro* de un extracto derivado de mucílago de café sobre el crecimiento de microorganismos de importancia en la industria alimentaria.

Objetivos específicos

1. Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en el extracto proveniente de mucílago para identificar sus posibles sustancias activas.
2. Evaluar el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de un extracto derivado de mucílago de café, sobre el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas y/o asociadas con el deterioro de los alimentos y sobre bacterias de la microbiota intestinal del ser humano.

Hipótesis

El mucílago producido durante el procesamiento del café contiene compuestos fenólicos capaces de incidir en el crecimiento de bacterias de importancia en la industria alimentaria.

Marco teórico

A lo largo de la historia, la comunidad científica se ha interesado por prospectar compuestos naturales con capacidad antimicrobiana, esto debido, entre otras cosas, a que el uso de antibióticos, desinfectantes y preservantes químicos tradicionales ha hecho que aumente no solo la resistencia de los patógenos a los agentes antimicrobianos asociados a los alimentos sino también que algunos microorganismos de deterioro hayan desarrollado tolerancia a diferentes procesos que se utilizan para preservar los alimentos (Aydin & Caniklioglu 2021; Gemechu, 2020, Lima *et al.*, 2016; Barbieri *et al.*, 2017). Aunado a esto, los consumidores buscan cada vez más alimentos que, además de nutrirlos, ofrezcan beneficios a la salud (Fernandes de Araujo *et al.*, 2021; Mendes dos Santos *et al.*, 2021; Olszewska *et al.*, 2020).

Entre las alternativas de interés se encuentran los compuestos fenólicos presentes en frutas y vegetales (Fernandes de Araujo *et al.*, 2021; Rashmi & Negi, 2020; Kumar & Goel, 2019; Brigitta *et al.*, 2016). El fruto del café, es una de estas opciones, ya que presenta importantes cantidades de ácidos clorogénicos (Angeloni *et al.*, 2019; Clifford *et al.*, 2017) y otros compuestos fenólicos que en apariencia son capaces de inhibir el desarrollo microbiano (Khochapong *et al.*, 2021; Naveed *et al.*, 2018; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013b). No obstante, aunque es conocido el potencial del fruto del café, los subproductos que se generan durante el procesamiento del grano han sido poco explorados en cuanto a su potencial como fuente de compuestos bioactivos. En especial, hay un gran vacío con respecto al subproducto conocido como mucílago.

El café, su procesamiento y la generación de subproducto

Para obtener el café verde o café oro, que es el que se comercializa a nivel mundial (Esquivel & Jiménez, 2012), el fruto del café debe pasar por una serie de procesos. Existen, básicamente, dos metodologías de procesamiento: seca o húmeda (Hejna, 2021). Ambos procesos inician con la recolección del grano, posteriormente se extraen las semillas (proceso seco o húmedo) y se secan. El grano seco pasa por más procesos, de pelado, tostado y molido, para obtener el café con el que se elabora la bebida (Gemechu, 2020).

En Costa Rica, a gran escala se utiliza el método de procesamiento húmedo (Adams, *et al.*, 2007), con el cual se procesan sólo los frutos maduros. Luego de recolectado el fruto, se traslada al recibidor y de ahí al beneficio dentro de las siguientes 24 horas. Los granos o cerezas de café, al llegar al beneficio, son pesados y colocados en sifones (tanques en forma de pirámide invertida) con agua. Ahí se da la primera clasificación del proceso, ya que los frutos menos densos, verdes o enfermos flotan, mientras que aquellos que se depositan en el fondo son los que se procesarán como de mejor calidad. Luego de esto se separan las partículas extrañas y se procede a pasar los granos de café al despulpador, donde se separa la cáscara y la pulpa, obteniéndose el café “en baba”. Posteriormente, una máquina desmucilagadora elimina el mucílago para obtener finalmente granos recubiertos por el pergamino (Alves *et al.*, 2017; Umaña, 2014). Luego, los granos se clasifican mediante un tamiz de acuerdo con su tamaño y así el café está listo para ser enviado al proceso de secado, el cual se puede llevar a cabo en horno o de manera natural, extendiendo el café en capas de hasta 4 centímetros de alto y volteando tres veces al día.

Al cabo de 4 ó 5 días los granos adquieren un color verde oliva y pueden ser empacados en sacos para su comercialización (Ghosh & Venkatachalapathy, 2014).

Como se observa, el proceso consta de múltiples operaciones unitarias (Figura 2) y en cada una de ellas se producen diferentes residuos que potencialmente pueden resultar de interés para industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias (Gemechu, 2020; Olszewska *et al.*, 2020; Dorsey & Jones, 2017).



Figura 2: Esquema beneficiado de café. Proceso húmedo (elaboración propia, imágenes tomadas de Internet)

En este proceso húmedo se generan residuos diferentes a los que resultan del proceso seco (Echeverría & Nuti, 2017), en el cual el grano de café simplemente se seca, normalmente al sol, y luego se descascara (Hejna, 2021; Magoni *et al.*, 2018), produciendo solamente cáscaras secas “husk” como subproducto (Echeverría & Nuti, 2017; Murthy & Naidu, 2012).

Del proceso húmedo del grano de café se obtienen, como subproductos, en la primera etapa antes del secado: broza (cáscaras y pulpa), mucílago y pergamino (Magoni *et al.*, 2018;

Esquivel & Jiménez, 2012). El grano de café ya seco se somete a otros procesos donde se producen subproductos como la cascarilla plateada o “silverskin” (Murthy & Naidu, 2012).

En Costa Rica, el Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE) ha determinado que por cada fanega (253 kg) de café cereza se producen 105.2 kg de pulpa o broza, 39.5 kg de mucílago, 57.9 kg de pergamino, 10.9 kg de cascarilla y finalmente sólo 47,1 kg de café oro (comunicación personal con el Ing. Rolando Chacón Araya M.Sc., Jefe de la Unidad de Industrialización y sección de Control de Calidad del ICAFFE). Se observa como para obtener 47 kg de café oro se genera una cantidad importante de residuos.

Con los años el proceso se ha ido mejorando y haciendo más eficiente, tratando de obtener mejores resultados y generando menos cantidad de subproductos. No obstante, si se correlaciona la producción de café a nivel nacional con la densidad aparente de los subproductos generados, la cantidad producida es considerable. Ahora si esto se traslada a nivel mundial, la generación de estos residuos realmente es masiva, lo que genera un reto relacionado con su manejo responsable y adecuado (Hoseini *et al.*, 2021; Janissen & Huynh, 2018).

En los últimos años y con la idea de hacer que el procesamiento húmedo del café sea sostenible y amigable con el ambiente, subproductos como la broza y las cáscaras de café han sido utilizadas como fertilizante y como sustrato para lombricompost (Mussatto & Teixeira, 2013; Murthy & Naidu, 2012). Más recientemente, se ha descrito también, la utilidad de estos subproductos como un eficiente sustrato útil en la producción de ciertas enzimas de interés

comercial, ácidos orgánicos, diferentes aromatizantes, saborizantes, bioetanol y en la producción de hongos comestibles (Gemechu, 2020; Janissen & Huynh, 2018; Dorsey & Jones, 2017; Hikichi *et al.*, 2017).

Además de las aplicaciones arriba mencionadas, es conocido que estos subproductos contienen también gran cantidad de compuestos bioactivos (Esquivel *et al.*, 2020; Iriondo-De-Hond *et al.*, 2019; Duangjai *et al.*, 2016) que son de utilidad por sus diversas propiedades. A nivel de la comunidad científica existe gran interés en impulsar la investigación en esta línea, con el fin de generar beneficios en la cadena productiva y contribuir a mejorar el manejo de los desechos que genera esta actividad agrícola de gran interés a nivel mundial (Gemechu, 2020).

Existe gran cantidad de publicaciones que informan acerca de caracterización de compuestos bioactivos y posibles aplicaciones de los subproductos que generan los países que industrializan el “grano oro” o “café verde” (Hejna, 2021; Gemechu, 2020; Kamgang, *et al.*, 2020; McNutt & He, 2019; Janissen & Huynh, 2018; Jiménez-Zamora *et al.*, 2015); sin embargo, la investigación sobre los mismos temas, pero referida a los subproductos del proceso del fruto del cafeto, que se generan en los países productores, especialmente la pulpa y el mucílago, es relativamente escasa (Khochapong *et al.*, 2021; Manasa *et al.*, 2021; Martínez-Alemán *et al.*, 2019; Magoni *et al.*, 2018; Duangjai *et al.*, 2016). Con respecto a la pulpa de café se menciona que éste es el subproducto más abundante que se obtiene del procesamiento del fruto (Duangjai *et al.*, 2016). Nutricionalmente se informa que contiene 50% de carbohidratos, 20% de fibra, de un 7 a un 10% de proteínas, hasta un 2.5% de grasa y de 0.68 a 1.3% de cafeína (Martínez-Alemán *et al.*, 2019). Se indica que es un sustrato con

gran capacidad antioxidante y antimicrobiana con mucha potencialidad para el uso en la industria alimentaria (Magoni *et al.*, 2018). Las investigaciones señalan que contiene cantidades importantes de distintos compuestos polifenólicos en los que los ácidos clorogénicos y la cafeína resultan ser los más abundantes (Manasa *et al.*, 2021; Duangjai *et al.*, 2016). Khochapong *et al.* (2021) recientemente reportan que procesos artificiales de digestión de extractos de pulpa de café no comprometen su capacidad antimicrobiana y antioxidante (Khochapong *et al.*, 2021). Diferentes investigadores incentivan la revalorización de este subproducto como fuente de pectinas, compuestos fenólicos y cafeína para uso en diferentes industrias (Manasa *et al.*, 2021), especialmente la alimentaria, ya que se ha descrito que extractos de pulpa de café no muestran citotoxicidad y sí poseen actividad antiinflamatoria en líneas celulares de epitelio gástrico (Magoni *et al.*, 2018).

Con respecto al mucílago, únicamente se reporta su caracterización química, la cual indica que posee mayormente carbohidratos (81%), compuestos nitrogenados (8.7%) y cenizas (4.04%). A pesar de haber hecho una exhaustiva revisión bibliográfica no se logró encontrar reportes sobre polifenoles en este sustrato (Puerta & Ríos 2011).

Compuestos fenólicos y subproductos del café

Bajo el termino compuestos fenólicos se agrupa un conjunto de sustancias muy heterogéneas que en su estructura poseen funciones hidroxibenceno (fenol), unidas a compuestos aromáticos o alifáticos. Existen muchos compuestos fenólicos muy variados, que se clasifican de acuerdo con el número de anillos fenólicos y los grupos funcionales ligados a estos (Figura 3). Se dividen en: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (Loo *et al.*, 2020). Los primeros se clasifican en: antocianinas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, 3-flavonoles y

flavonones. Los ácidos fenólicos se dividen en ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, donde se ubican los ácidos clorogénicos (Loo *et al.*, 2020).

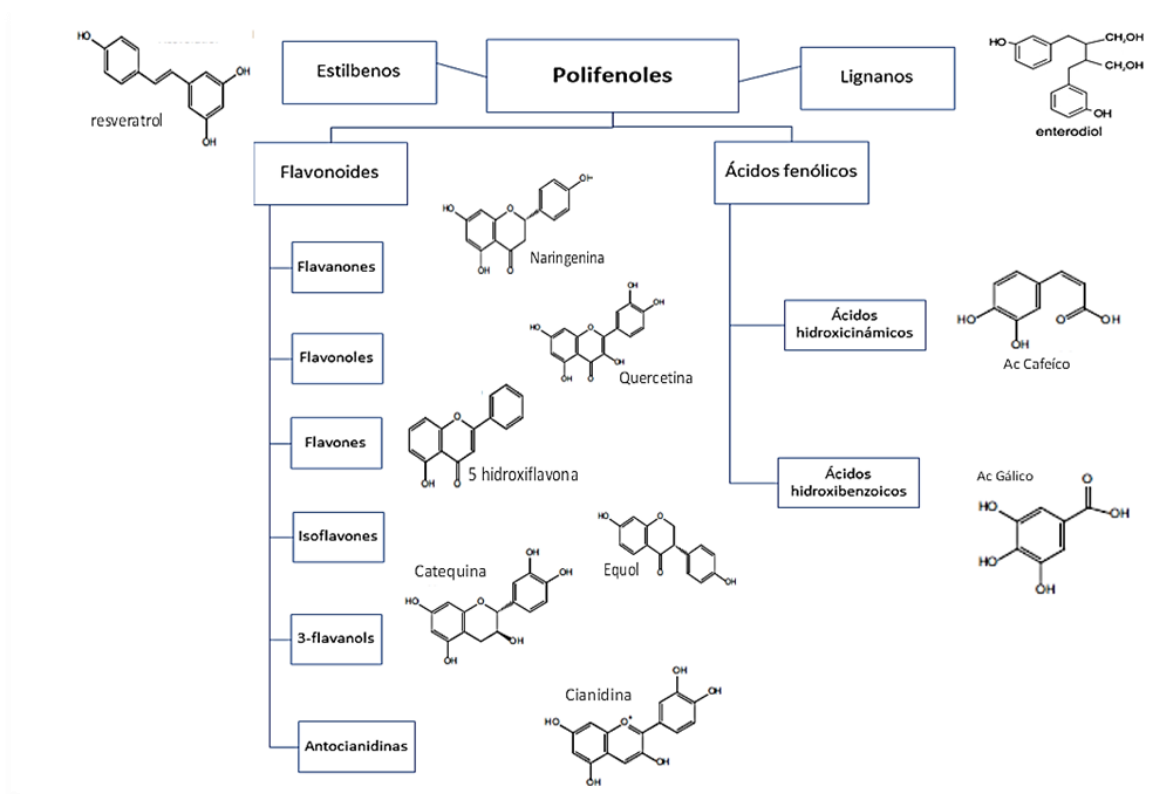


Figura 3: Clasificación de compuestos polifenólicos y ejemplos de sus estructuras (Modificado de Loo *et al.*, 2020)

Los polifenoles están presentes en gran cantidad de alimentos de origen vegetal, como frutas, verduras, cereales, y en bebidas, como vino, té, cerveza y café (Mithul Aravind *et al.*, 2021; Fernández de Araujo *et al.*, 2021; Rashmi & Negi, 2020). Se consideran metabolitos secundarios de las plantas que actúan como fitoalexinas (defensa contra posibles ataques bacterianos o fúngicos en plantas con lesiones) y están relacionados con los colores de frutos y plantas (Rashmi & Negi, 2020; Kumar & Goel, 2019). Uno de los más importantes grupos de compuestos fenólicos son los conjugados de ácido quínico, conocidos como ácidos clorogénicos (CGA.), que principalmente son formados por la esterificación de ácido quínico

con ácido caféico, ferúlico o p-cumárico (Figura 4) (Kumar & Goel, 2019). Este tipo de compuestos están presentes en muchas frutas, plantas comestibles y bebidas como el mate y el café (Clifford *et al.*, 2020; Naveed *et al.*, 2018). Doscientos mililitros de jugo de manzana pueden contener 25 mg de ácidos clorogénicos, 100 g de alcachofas 268 mg, 200 ml de mate entre 94 y 111 mg, mientras que 52 ml de café expreso pueden contener hasta 422 mg de ácidos clorogénicos. Se considera, entonces, la bebida de café como una de las fuentes dietarias de ácidos clorogénicos más importantes para el ser humano (Clifford *et al.*, 2017). En los granos de café verde se han identificado 72 diferentes ácidos clorogénicos, siendo el principal de ellos el ácido 5-cafeoilquínico (Figura 4) (Clifford *et al.*, 2017). Esta diversidad y disponibilidad de ácidos clorogénicos aunado a la abundante producción cafetalera en Costa Rica hacen que tanto el grano del café, como los subproductos generados en el procesamiento, sean una materia prima de interés para la extracción de estos compuestos, con miras a innovar en sus aplicaciones biotecnológicas, maximizando el uso de los recursos de producción nacional.

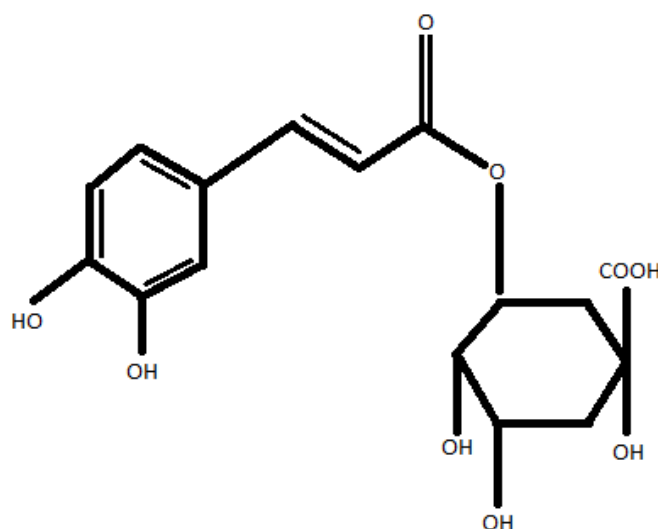


Figura 4. Estructura del ácido 5-O-cafeoil-ácido quínico (ácido clorogénico).

Los ácidos clorogénicos han sido objeto de múltiples investigaciones ya que al parecer son potencialmente beneficiosos para el ser humano debido a su capacidad antioxidante, hipoglucemiante, antiviral, hepatoprotectora y nutraceutica, entre otras cosas (Mithul Aravind *et al.*, 2021; Fernández de Araújo, *et al.*, 2021; Gemechu, 2020; Basar & Sanlier 2019; Clifford *et al.*, 2020; Naveed *et al.*, 2018). Sin embargo, los ácidos clorogénicos no sólo están presentes en la bebida de café, en el café tostado o en el verde, sino que también los residuos producidos durante el procesamiento del grano contienen diferentes cantidades de éstos y otros compuestos fenólicos. De acuerdo con Ramírez y Martínez (1988), citados por Esquivel & Jiménez (2012), la pulpa fresca de café contiene ácido clorogénico, el cual alcanza el 42,2% del total de compuestos fenólicos identificados en este sustrato. Análisis más recientes confirman que los ácidos 5-O, 4-O y 3-O- cafeoilquínico son componentes constantes de la pulpa y la cáscara de los granos maduros de café (Esquivel *et al.*, 2020).

Se conoce que la bebida de café es una de las fuentes dietarias más importantes de ácidos clorogénicos (Clifford *et al.*, 2017). No obstante, también es conocido que, durante el procesamiento del grano de café, para obtener el café tostado y molido con el que se elabora la bebida, este conjunto de sustancias químicas sufre gran deterioro; se estima una pérdida de hasta el 90% de su contenido (Clifford *et al.*, 2017; Clifford, 2020). Sin embargo, se postula que esta pérdida se da a expensas de transformaciones químicas, por lo que es posible detectar un aumento de hasta más de 200 diferentes fragmentos de ácidos clorogénicos cuando se analizan los granos de café tostado mediante espectrometría de masas, mientras que en el grano verde es posible identificar apenas cerca de 72 derivados del ácido quínico (Clifford *et al.*, 2017).

A pesar de que la bebida de café sigue siendo la que aporta mayor cantidad de ácido clorogénico a la dieta humana, también los residuos que se generan para obtenerla poseen importantes cantidades de estos químicos, por lo que estos subproductos han venido ganando interés entre científicos e industriales.

La pulpa (broza) de café constituye el subproducto más abundante del procesamiento de la fruta pues representa cerca del 40% del peso de la cereza. Sus principales componentes son carbohidratos, celulosa y hemicelulosa. Posee también cantidades importantes de cafeína y ácidos clorogénicos (Hejna, 2021; Manasa *et al.*, 2021; Mendes dos Santos *et al.*, 2021; Esquivel *et al.*, 2020). En su composición, es bastante similar a las cáscaras (husk) generadas en el procesamiento seco del café; sin embargo, el husk es preferido como sustrato para extracción de compuestos bioactivos ya que posee menor cantidad de humedad (Gemechu, 2020). Duangjai *et al.*, (2016) analizaron diferentes extractos acuosos de pulpa de café y concluyeron que los ácidos clorogénicos y la cafeína son los compuestos activos mayoritarios. Ambos poseen actividad antimicrobiana y específicamente los ácidos clorogénicos tienen alta capacidad antioxidante. Señalan también estos investigadores que hay numerosos compuestos más en los extractos de pulpa de café que deben ser purificados y estudiados, ya que tienen gran potencial para ser usados como ingrediente en la industria alimentaria (Duangjai *et al.*, 2016).

Recientemente Esquivel *et al.* (2020) analizaron pulpa y cáscaras de café de diferente color (rojo, amarillo, anaranjado). Utilizando cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas, determinaron que el ácido 5-O cafeoilquínico y una epicatequina

putativa fueron los compuestos fenólicos predominantes. Detectaron también antocianinas en las cáscaras rojas, pero no en las amarillas; no obstante, en éstas encontraron betacaroteno y luteína. Las diferencias encontradas y relacionadas con el color de la fruta reafirman el uso potencial de subproductos del café como fuente de compuestos bioactivos (Esquivel *et al.*, 2020).

Otro de los subproductos obtenidos durante el procesamiento del café es el mucílago. Esta matriz es considerada un hidrogel. Su composición es similar a la de la pulpa (Hejna, 2021) y representa cerca del 5% del peso seco del grano (Morales, 2021). Está compuesto básicamente por agua, azúcares (principalmente reductores), pectinas y ácidos orgánicos (López, 2017; Puerta & Ríos, 2011). Se conoce muy poco sobre su contenido de polifenoles (Esquivel & Jiménez, 2012; Rathinavelu & Graziosi, 2005).

El pergamino, otro de los residuos generados, es utilizado en los beneficios para alimentar los hornos de secado, en la producción de papel, diferentes polímeros y compostaje (Hejna, 2021; Echeverría & Nuti, 2017). Está compuesto por celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas (Esquivel & Jiménez, 2012). Representa del 5.8 al 6.1% del peso seco del fruto del café (Hejna, 2021). Contiene muy poca cantidad de ácidos clorogénicos pero alta cantidad de cafeína (Iriondo *et al.*, 2019). Por su alto contenido de fibra insoluble, se ha planteado su incorporación en alimentos como galletas, aumentando así la cantidad de fibra y el poder antioxidante del producto final (Hejna, 2021). Al igual que con el mucílago, hay pocos datos acerca de compuestos bioactivos presentes en este subproducto (Gemechu, 2020; Esquivel & Jiménez, 2012).

Sobre el “silverskin”, al contrario de los dos últimos subproductos citados, sí hay buena cantidad de información (Hejna, 2021; Castaldo *et al.*, 2020; Gemechu, 2020; Iriondo *et al.*, 2019, Janissen & Huynh, 2018). Se calcula que esta matriz representa cerca del 4.2% del grano de café, tiene baja humedad, es rica en fibra dietética y posee un contenido de proteína mayor al de otros subproductos del café (Hejna, 2021). Nzekoue *et al.* (2020) cuantificaron mediante HPLC-MS/MS 30 diferentes compuestos, resultando los ácidos clorogénicos (3-CQA, 5CQA y 3,5 diCQA) los polifenoles más abundantes, con concentraciones que van desde 3115.6 hasta 5444.0 $\mu\text{g/g}$, lo cual representa del 78.5 al 96.8% del total de polifenoles detectados en el “silverskin”. Este subproducto, al ser generado en los países que industrializan el grano, ha recibido mucha atención por parte de la comunidad científica, la cual busca valorizarlo y evitar que contamine el ambiente.

Efecto antimicrobiano de los polifenoles

Varios autores han reportado que extractos de café verde poseen una importante actividad antimicrobiana, principalmente contra bacterias Gram-positivas (Wang *et al.*, 2017; Suarez-Quirós *et al.*, 2013a, Lou, *et al.*, 2011; Martínez-Tomé *et al.*, 2011) y se atribuye la misma a los ácidos clorogénicos que se encuentran en gran cantidad en esta matriz (Budryn *et al.*, 2014; Suarez-Quirós *et al.*, 2013a; Esquivel & Jiménez, 2012; Lou *et al.*, 2011, Martínez-Tomé *et al.*, 2011). Suarez-Quirós *et al.* (2013) investigaron la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de ácido clorogénico y duodecil clorogenado, observando que estos compuestos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias como *E. coli* y *S. aureus*; sin embargo, no observaron inhibición contra *Salmonella enterica*. A pesar de esto, ellos mismos reportan que con concentraciones mayores de ácido clorogénico otros investigadores sí lograron inhibir esta bacteria. Adicionalmente, en este mismo trabajo informan que no

lograron observar actividad del ácido clorogénico contra esporas de *Bacillus cereus* ni de *Clostridium sporogenes*.

Diferentes extractos de pulpa de café han demostrado inhibir el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Khochapong *et al.*, 2021; Duangjai *et al.*, 2016), siendo esa inhibición relevante al compararse con la producida por antibióticos β -lactámicos (penicilina y ampicilina). Este hallazgo hace pensar que este subproducto tiene un potencial uso en el campo industrial.

Extractos de “silverskin” también han sido evaluados en su actividad antimicrobiana y se ha establecido que no tienen efecto sobre el crecimiento de *C. albicans*. No obstante, sí logran inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, (Rodrigues *et al.*, 2015).

Es importante destacar que, aunque desde hace algún tiempo ya se tenía evidencia científica acerca del efecto antibacteriano de los ácidos clorogénicos, no fue hasta hace relativamente poco que Lou y colaboradores (2011) lograron establecer que dicha actividad es el resultado de cambios irreversibles en la permeabilidad de la membrana celular, que a su vez generan la pérdida del potencial de la misma, causando la muerte celular (Suarez-Quirós *et al.*, 2013a; Lou, *et al.*, 2011).

Interesantemente, a partir de extractos de café tostado, también se ha reportado actividad inhibitoria contra diversos microorganismos, a pesar de que los niveles de ácidos clorogénicos se ven disminuidos hasta en un 90% (Clifford *et al.*, 2017) por la operación de tueste (Esquivel

& Jiménez, 2012). Aparentemente, la actividad antimicrobiana descrita para estos extractos de café tostado es efectiva contra bacterias como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, varias enterobacterias y *Legionella pneumophila* (Monente *et al.*, 2015; Runti *et al.*, 2015; Almeida, *et al.*, 2012; Antonio *et al.*, 2011; Martínez-Tomé, *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2006). Martínez-Tomé *et al.* (2011) realizaron un estudio con cepas de *S. aureus*, *E. fecalis*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. choleraesius*, las cuales enfrentaron a diferentes cantidades (30, 60, 100, 150, 200 y 300 µl) de una solución de 300 µg/ml de café tostado proveniente de Colombia y África. Utilizaron como referencia, para evaluar la actividad inhibitoria de estos cafés, una solución de 300 µg/ml de cloranfenicol. Estos investigadores lograron encontrar que a mayor concentración de café (1 µg/ml) mayor inhibición bacteriana (halo de 32.33 mm) se podía obtener, siendo *S. aureus* la bacteria más sensible a los extractos de café utilizados en el estudio. Ellos teorizan que la inhibición del crecimiento que observaron no es debida a un único mecanismo, sino, por el contrario, existen complejas interacciones entre los compuestos del café que contribuyen a los resultados obtenidos. Mencionan que el mecanismo tóxico que exhiben los ácidos fenólicos incluye la inhibición por los compuestos oxidados, junto con la reacción de los grupos sulfhidrilo o con interacciones no específicas con las proteínas (Martínez-Tomé *et al.*, 2011).

Actualmente, se conoce que el efecto antimicrobiano de los extractos de café tostado se debe principalmente a la acción de las melanoidinas producto de las reacciones de Maillard y caramelización que ocurren al tostar el café. Las melanoidinas son compuestos químicos de alto peso molecular (Figura 5) que se encuentran ampliamente distribuidos en los alimentos. Se ha descrito que “*in vitro*” presentan capacidad antioxidante (Rufián-Henares & Pastoriza, 2015), antihipertensiva, antimicrobiana y prebiótica (Rufián-Henares & Pastoriza, 2015;

Esquivel & Jiménez, 2012). El mecanismo por el cual ejecutan su actividad antimicrobiana aún no se conoce claramente; sin embargo, existen hallazgos que indican que esta bioactividad podría estar relacionada con su carga aniónica y su capacidad de quelar cationes metálicos, como magnesio, hierro, zinc y cobre, que resultan esenciales para el crecimiento y supervivencia de las bacterias, tanto patógenas como de deterioro (Ruffián-Henares & de la Cueva, 2009). En este sentido, Ruffián-Henares & de la Cueva (2009) lograron purificar, mediante técnicas de filtración, melanoidinas a partir de café tostado 100% arábico. Diferentes concentraciones de melanoidinas (0.1-8.0 mg/ml) fueron enfrentadas a varias cepas bacterianas con el fin de evaluar su actividad antimicrobiana. Los investigadores determinaron que las bacterias Gram-positivas fueron más sensibles a la acción de las melanoidinas que las Gram-negativas, lo cual relacionan con la ausencia de membrana externa en los Gram-positivos. Adicionalmente, en este estudio los investigadores concluyen que existen al menos tres diferentes mecanismos por los que las melanoidinas ejercen su efecto antimicrobiano. En bajas concentraciones, estas sustancias resultan bacteriostáticas debido a que quelan el hierro presente en el medio de cultivo, aunque no descartan que también otros iones sean quelados por las melanoidinas. Para las bacterias capaces de sintetizar sideróforos, demostraron la formación de complejos sideróforo-melanoidina que harían disminuir la virulencia de esos microorganismos. Y el tercer mecanismo se da a altas concentraciones de melanoidinas, debido a que éstas logran quelar el magnesio de las membranas externas, desestabilizando así su estructura y provocando daño celular con pérdida de componentes intracitoplasmáticos (Ruffián-Henares & de la Cueva, 2009).

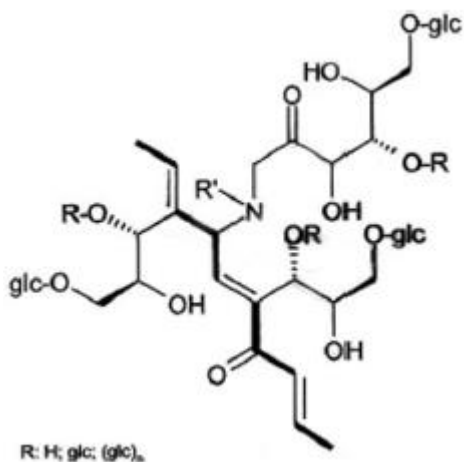


Figura 5. Ejemplo de estructura básica de melanoidina. Tomado de Naik *et al.*, 2008

Materiales y métodos

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Microbiología y en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica.

1. Mucílago de café

Se trabajó con mucílago de tres diferentes beneficios de café (Cuadro 1). Durante el proceso de beneficiado de la cosecha 2016 (diciembre 2015-marzo 2016) se colectó mucílago y se congeló a -80°C hasta el procesamiento de las muestras en un plazo no mayor a 1 año. En cada establecimiento se recolectó material de diferentes productores para homogenizar y disminuir la posibilidad de observar efectos idiosincráticos.

Cuadro 1: Altitud, coordenadas de ubicación de los beneficios y características sensoriales de la taza de café en las regiones cafetaleras de Costa Rica

Ubicación del Beneficio	Identificación	Altitud m.s.n.m	Coordenadas	Características sensoriales de la taza de café
Tres Ríos	B/BV	1407	9°54'27" N, 83°59'6" O	Acidez: alta y muy fina
				Cuerpo: muy bueno
				Aroma: muy bueno
San Marcos de Tarrazú	C/CF	1429	9°34'59.07"N, 84°3'53.36" O	Acidez: alta y fina
				Cuerpo: bueno
				Aroma: excelente
Moravia	A/C	1396	10°0'46"N, 84°1'20" O	Acidez: alta y muy fina
				Cuerpo: muy bueno
				Aroma: muy bueno

De las 8 regiones cafetaleras existentes en territorio nacional (Vignola *et al.*, 2018), los beneficios de los que se obtuvo el mucílago representan 3 de ellas: Tres Ríos, Tarrazú y Valle Central

2. Microorganismos utilizados

Se utilizaron las siguientes bacterias asociadas a deterioro: *Pseudomonas* sp. ATCC 27853, *Alcaligenes* sp. (UCR 277), *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *E. coli* ATCC 35150; como bacterias potencialmente patógenas: *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC14579, *Salmonella* sp. ATCC13311 y *L. monocytogenes* SLCC 4013. Adicionalmente, se utilizaron bacterias probióticas y/o asociadas a la biota intestinal del ser humano: *Lactobacillus*

acidophilus CRL730, *Lactobacillus casei* CRL431, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

3. Medios de Cultivo

El agar tripticasa de soya (ATS) se empleó para evidenciar el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, a excepción de las bacterias lácticas, las cuales fueron cultivadas en agar MRS (Man Sharp Rogosa).

4. Pruebas preliminares

A partir de esta materia prima se realizaron pruebas preliminares para evaluar la utilidad de diferentes solventes (metanol acidificado, metanol y etanol) en el proceso de extracción de polifenoles. Para ello se emplearon placas de 96 hoyos. En cada espacio de la placa se colocaron 50 μ l de una suspensión bacteriana de turbiedad semejante al estándar de McFarland 0.5 (10^8 UFC/ml), así como, la misma cantidad, de diluciones seriadas de esta suspensión para obtener aproximadamente 10^7 , 10^6 y 10^5 UFC/ml de cada uno de los microorganismos estudiados (Sección 2). Se agregó a cada pocillo 100 μ l de caldo tripticasa de soya y 50 μ l de extracto de broza o mucílago de café, para un volumen total por pocillo de 200 μ l.

Los extractos probados fueron obtenidos con los solventes metanol, metanol acidificado o etanol. Se probaron concentraciones de extracto desde 0.5 hasta 325 mg/ml. Estas placas se incubaron a 35°C por 24 horas con agitación constante. Cada 30 minutos se realizó

la lectura de absorbancia a 600 nm (Biotek Synergy HT). Se compararon las lecturas con las obtenidas para las diferentes bacterias en ausencia del extracto de mucílago. Los resultados indicaron que el crecimiento de las bacterias no permitía establecer un punto de corte para definir su inhibición. Esto se podía deber a que el extracto obtenido en todos los casos poseía un color oscuro bastante fuerte que podía estar interfiriendo con las lecturas de absorbancia. Se decidió entonces, utilizar el formato de macro dilución en agar.

Adicionalmente, se realizó medición de pH a cada uno de los extractos obtenidos con los diferentes solventes. En el caso del metanol acidificado se obtuvieron valores de 0.45 y 0.67, por lo que se descartó este solvente ya que el efecto inhibitorio al usarlo claramente sería por el pH del mismo. Analizando los resultados se decidió utilizar etanol al 95% como solvente, ya que el extracto producido con éste tenía valores de pH de 4 y 4.5, que al diluirse con agar llegaba a 6. Esto permitiría descartar el efecto de acidez en la inhibición observada sin necesidad de alcalinizarlo con alguna sustancia como NaOH.

En la Figura 6 se describe de forma general las actividades que se desarrollaron para alcanzar los objetivos propuestos.

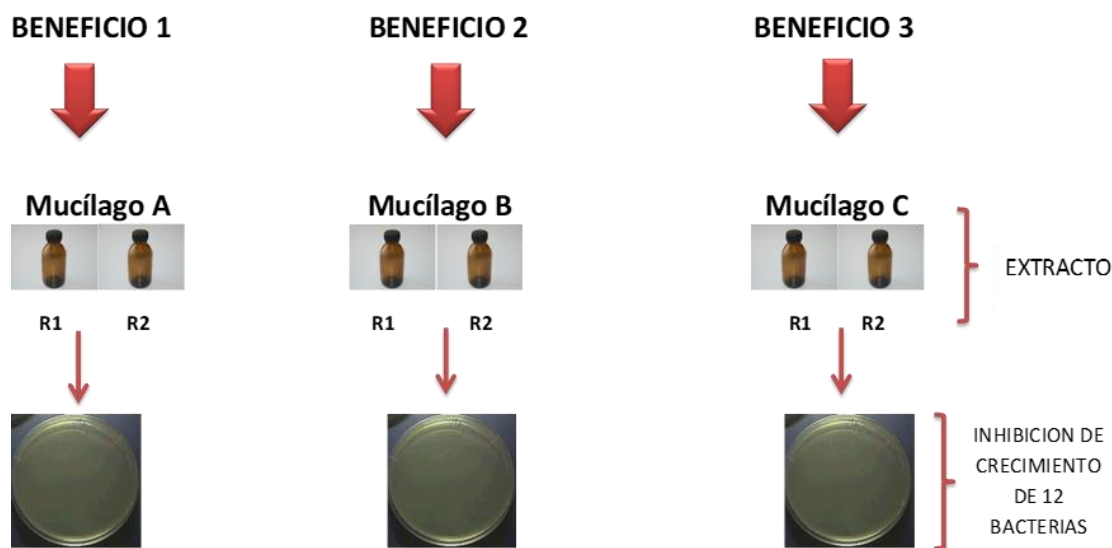


Figura 6. Esquema general del procedimiento a seguir para determinar el efecto in vitro sobre el crecimiento de 12 especies bacterianas de extractos de mucílago.

5. Obtención de extracto a partir de mucílago

Se utilizó la metodología descrita por Mingo *et al.* (2016) con algunas modificaciones como se describe a continuación: se liofilizó el mucílago utilizando un liofilizador Benchtop Pro 3L ES 55Virtis Sp Scientific. La extracción se realizó en una relación 1:4 muestra deshidratada-solvente (etanol 95%). Se homogenizó con un Ultraturrax (Tissue Tearor modelo 98537Q-395) durante 5 minutos. Posteriormente se traspasó todo el homogenizado a tubos de centrifuga y se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm. Transcurrido el tiempo, se decantó el sobrenadante y al sólido se le repitió el proceso de extracción 3 veces más.

Una vez concluido el proceso anterior, se juntaron todos los sobrenadantes y se filtraron a través de papel Whatman N°1 aplicando vacío (Büchner). Posteriormente se eliminó el disolvente llevando a sequedad por evaporación en rotavapor (Buchi Rotavapor R-124) con las siguientes condiciones: vacío 67 mbar y posteriormente 33 mbar, líquido de enfriamiento

10°C, temperatura del baño 50°C. Para finalizar el proceso, se reconstituyó el concentrado en agua destilada estéril con el volumen suficiente para alcanzar una concentración de polifenoles de 0,7 g/ml (concentración determinada en pruebas preliminares descritas). Las muestras así tratadas se congelaron a -80°C, hasta su utilización. Esto con el fin de evitar la degradación de los compuestos fenólicos presentes en el extracto.

6. Cuantificación de compuestos fenólicos presentes en el extracto proveniente de mucílago para identificar sus posibles sustancias activas.

6. 1. Diseño experimental

Se analizó la composición química del extracto de mucílago para cada una de las tres repeticiones (A, B, C) mediante HPLC/PDA, por duplicado. Se utilizó una columna Phenomenex (Torrance, CA, USA) C18 Hydro-Synergi (150 x 3.0 mm i.d., 4 µm particle size) con una precolumna C18 ODS (4.0 x 2.0 mm i.d.) operada a 25°C. Para el análisis de ácidos fenólicos la fase móvil consistió en una mezcla de ácido acético al 2% (v/v) en agua (eluyente A) y 0,5% de ácido acético en agua y MeOH (10:90, v/v; eluyente B). El tiempo de elución fue de 60 min, con una velocidad de elución de 0.4 ml/min. Se utilizó un volumen de inyección de 10 µl. Los ácidos clorogénicos fueron detectados a 280 y 320 nm.

La identificación de compuestos se realizó considerando el espectro de absorción ultravioleta de los mismos y sus tiempos de retención. Además, se contó con el análisis de un extracto mediante LC/MS (Cuadro 2) realizado en la Universidad de Hohenheim, Stuttgart, Alemania,

como apoyo para la identificación de dichos compuestos (Kammerer *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos para ácidos clorogénicos se compararon con la referencia de Clifford *et al.* (2003) y los de cafeína con el respectivo estándar. La abundancia relativa de los componentes de los extractos fue determinada a través del cálculo del área porcentual de cada componente con respecto al área total en el cromatograma.

Cuadro 2. Tiempos de retención, espectros ultravioleta/visible y datos del espectro de masas de un extracto de mucílago de café

Identidad del compuesto	Tiempo de retención	Absorción máxima HPLC-UV/Vis (nm)	[M]⁺[M-H]⁻ m/z^a	Fragmentos MS/MS m/z^b	Referencia
Ácido clorogénico (4-acyl CGA dehidratada)	3.1	264	173	155(100)	Clifford <i>et al.</i> (2003)
Cafeína	27.1	234, 270	195	161 (100)	Estándar

^aModo de iones positivos: cafeína. ^bModo de iones negativos: ácidos fenólicos.

6. 2. Análisis estadístico

Se expresó el promedio y la desviación estándar para cada pico, con el fin de hacer una descripción del perfil de compuestos fenólicos.

7. Evaluación del efecto in vitro de extractos de mucílago de café, sobre el crecimiento de bacterias

Se empleó la metodología de macrodilución en agar propuesta por Thomas *et al.* (2015), con algunas modificaciones. Para ello se prepararon 6 erlenmeyer con 50 ml de agar tripticasa de soya (ATS). Luego de autoclavar, al medio se le agregaron diferentes cantidades de extracto de mucílago ajustados a una concentración de 700 mg de extracto por mililitro, empezando en 5 ml y terminando en 0,5 ml. Con esto se logró obtener platos de agar con diferentes concentraciones del extracto de mucílago, como se describe en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Concentraciones finales de extracto de mucílago añadidas a los platos Petri

Plato	Cantidad de extracto añadido (700 mg/ml)	Concentración final del extracto en el agar
1	5 ml	63,6 mg/ml
2	4 ml	51,9 mg/ml
3	3 ml	39,6 mg/ ml
4	2 ml	26,9 mg/ml
5	1 ml	13,72 mg/ml
6	0,5 ml	6,93 mg/ml
7 (Control)	0 ml	0 mg/ml

Las cepas bacterianas utilizadas se diluyeron en agua peptonada estéril 0,1% (APE) hasta alcanzar una densidad poblacional que generó una turbiedad comparable a la del estándar 0,5 de McFarland.

Los platos de ATS con las diferentes cantidades de extracto de mucílago fueron inoculados con 10 μ l de las suspensiones bacterianas previamente descritas. Las placas inoculadas fueron incubadas por 24 horas a 35°C y transcurrido el tiempo se examinaron para determinar si hubo crecimiento bacteriano (Figura 7). Se utilizaron placas sin inocular como control de esterilidad y placas sin extracto como control de viabilidad de las bacterias en estudio. Para las bacterias lácticas, se siguió el mismo procedimiento, pero empleando agar MRS en lugar del ATS e incubando 48 horas a 35°C en jarra con candela. En todos los casos, el pH final de las placas de ATS se mantuvo en un rango de entre 6 y 7. Las placas de MRS tuvieron un pH final de entre 5 y 6. En ambos casos esta característica fue dependiente de la cantidad de extracto que se agregó.

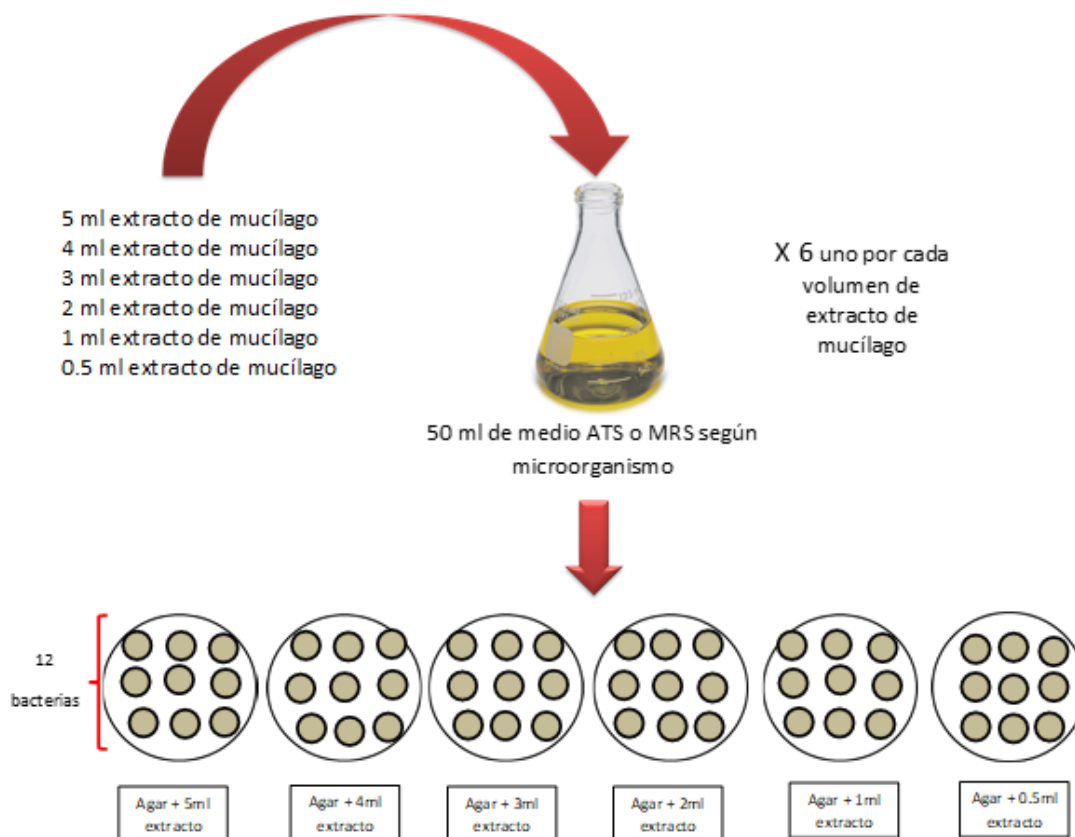


Figura 7. Esquema de procedimiento a seguir para evaluar el efecto de los extractos fenólicos sobre diversas bacterias.

7.1. Diseño experimental

El mucílago proveniente de los tres beneficios se consideró un lote único, con tres repeticiones diferentes (beneficio A, B o C). Por tanto, se tiene un diseño en bloques con un arreglo de dos factores. El factor uno es la concentración del extracto con tres niveles a saber: concentración alta (50.4 mg/ml), concentración media (26.2 mg/ml) y concentración baja (6.7 mg/ml). El factor dos es el tipo de bacteria, con únicamente dos niveles: bacterias deterioro/patógenas (DP) y bacterias asociadas a la biota intestinal (ABI). La variable respuesta en todos los casos es el crecimiento bacteriano visible a las 24 horas para las bacterias potencialmente patógenas

y de deterioro y a las 48 horas para las asociadas con la biota intestinal. La diferencia en los tiempos de incubación es debida al tiempo de generación de las bacterias ABI. En el cuadro 4 se muestra el diseño experimental para evaluar el efecto del extracto de mucílago sobre los microorganismos.

Cuadro 4: Tratamientos a aplicar para evaluar el efecto del extracto de mucílago sobre el crecimiento de microorganismos de deterioro, patógenos y asociados a la flora intestinal del ser humano.

Bloque	Factor	Niveles*
Beneficio A	Concentración del extracto	Alta
		Media
		Baja
	Tipo de bacteria	DP
		ABI
Beneficio B	Concentración del extracto	Alta
		Media
		Baja
	Tipo de bacteria	DP
		ABI
Beneficio C	Concentración del extracto	Alta
		Media
		Baja
	Tipo de bacteria	DP
		ABI

*DP: deterioro y/o Patógena, ABI: asociadas a la biota intestinal.

7. 2. Cuantificación del efecto inhibitorio

Adicionalmente a los procedimientos descritos, y con el propósito de establecer qué tan efectiva es la inhibición producida por el extracto de mucílago de café, se utilizó la metodología A.O.A.C. 960.09 Acción desinfectante, germicida y detergente de desinfectantes (Iñiguez-Moreno *et al.*, 2017), con algunas modificaciones. En esta metodología, una cantidad conocida de bacterias se enfrentan al extracto en diferentes tiempos de contacto. De esta manera, terminado el tiempo de contacto se realiza un recuento bacteriano para así consignar cuántos logaritmos de la población inicial fue capaz de disminuir el extracto en estudio. Para este caso en particular se utilizó solamente la cepa de *B. cereus* ATCC14579, que fue la que mostró mayor susceptibilidad al extracto. Se siguió el siguiente procedimiento: a partir de una suspensión de *B. cereus* con una densidad óptica semejante al estándar 0.5 de McFarland se realizaron diluciones decimales en tubos con 9 ml de agua peptonada buferizada con 2% de peptona, hasta alcanzar la novena dilución decimal. Cada una de estas diluciones fue plateada en platos de agar Tripticasa de Soya, mediante la técnica de esparcido, utilizando un inóculo de 0.1 ml. Este procedimiento se realizó por duplicado. Estas placas así tratadas se incubaron a 35°C por 24 horas. Posterior a este tiempo, se realizó el conteo de las placas que presentaron entre 25 y 250 UFC. Este resultado se consignó como la cantidad de inóculo inicial.

De la suspensión inicial (McFarland 0.5) se tomaron 5 ml y se mezclaron con una cantidad igual del extracto de mucílago a una concentración de 0.8 mg/ml. A esta mezcla se le agregaron 2 ml de solución estéril de bicarbonato al 2.5%. Esto se hizo con el fin de mantener el pH en 6 y así descartar la variable pH como causante de la inhibición. Como control se utilizó un tubo con 5 ml de agua peptonada buferizada con 2% de peptona, 5 ml del extracto y 2 ml de solución estéril de bicarbonato al 2.5%. Los dos tubos se incubaron a temperatura

ambiente por 24 horas. De ambos tubos, a los 15 minutos 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas, se extrajo 1 ml, el cual se depositó en un tubo con 9 ml de agua peptonada estéril. Se realizaron diluciones trasvasando un 1 ml a tubos con 9 ml de agua peptonada estéril hasta alcanzar la novena dilución decimal. De cada tubo se tomó 0.1 ml y se distribuyó en placas de agar Tripticasa de Soya. Este paso se realizó por duplicado. Las placas se incubaron a 35°C y transcurridas 24 horas se contaron aquellas placas que tenía entre 25 y 250 UFC (Figura 8). Se utilizaron dos controles adicionales, un tubo con 5 ml del extracto más 5 ml de agua peptonada buferizada con 2% de peptona y otro con 5 ml de agua peptonada buferizada con 2% de peptona más 5 ml de la suspensión de *B. cereus*. El primer control se consideró como de esterilidad y el segundo de viabilidad de la bacteria.

7. 3. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se realizó un modelo de regresión logística para predecir la variable crecimiento (crece/no crece) en función de las variables independientes: concentración del extracto y tipo de bacteria. Esto se hizo utilizando el lenguaje de programación para estadística R con las librerías GLM. Usando la función de verosimilitud para una proporción binomial, se realizó la evaluación de la significancia estadística al 95% de confianza usando la prueba de razón de verosimilitud (Likelihood Ratio Test,

LRT) y la prueba chi-cuadrado.

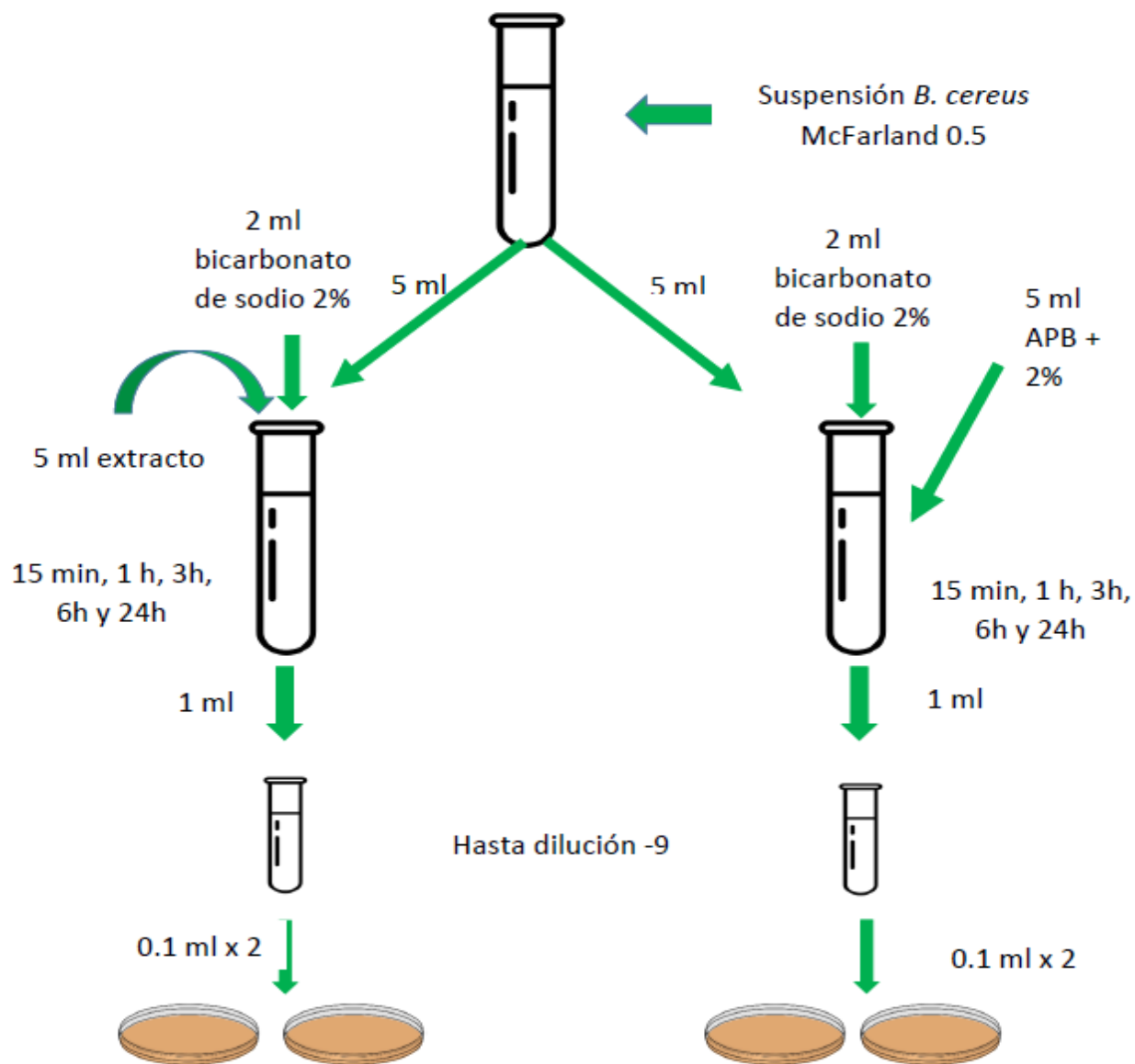


Figura 8. Procedimiento seguido para cuantificación de la inhibición

Resultados

Los extractos obtenidos se analizaron, mediante HPLC/PDA, con el fin de determinar los compuestos fenólicos presentes en ellos. En el cromatograma fue posible observar varios picos; los dos de mayor abundancia, corresponden a cafeína y a una mezcla de ácidos clorogénicos (Figura 9).

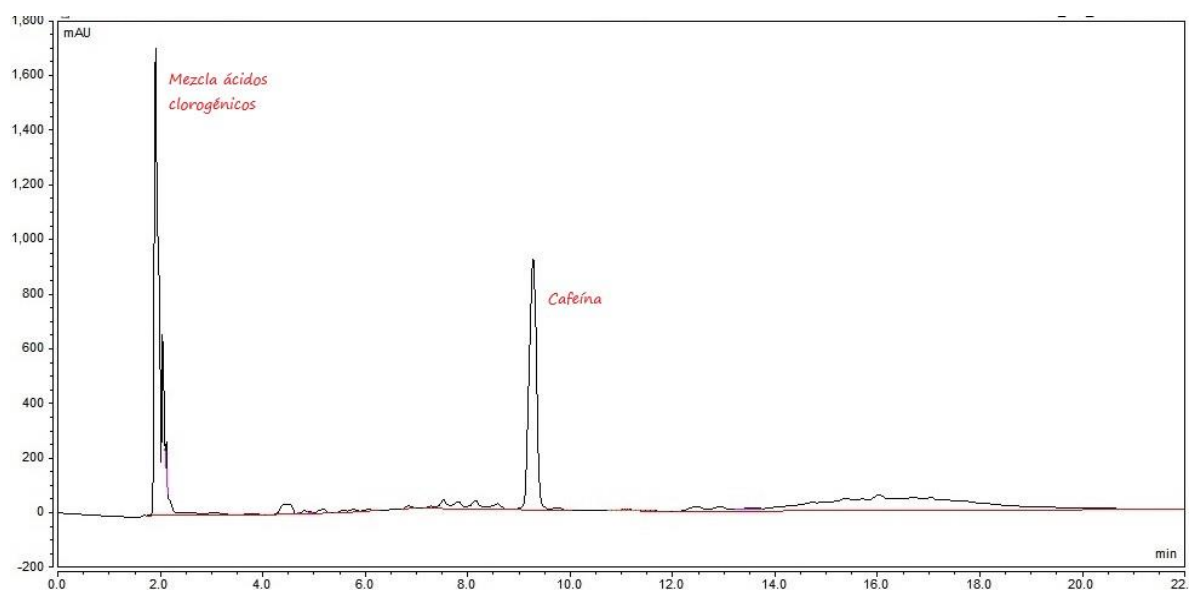


Figura 9. Cromatograma obtenido por HPLC/PDA de extracto de mucílago de café.

Con la determinación de las áreas bajo la curva del cromatograma y los tiempos de retención fue posible estimar la cantidad de la mezcla de ácidos clorogénicos y de cafeína presente en cada uno de los extractos obtenidos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Identificación y cuantificación de ácidos clorogénicos y cafeína presentes en el extracto de mucílago de café. *= medición única

Extracto de mucílago	Ácidos clorogénicos				Cafeína			
	Promedio tiempo de retención	Área	% Área relativa	Concentración promedio mg/ml	Promedio tiempo de retención	Área	% Área relativa	Concentración promedio mg/ml
A	1.95 ± 0.00	193.86	17.48	4.76 ± 0.47	9.23 ± 0.00	456.23	41.14	6.48 ± 0.77
B	1.94 ± 0.03	99.76	20.64	2.67 ± 1.0	9.28 ± 0.00	128.43	26.0	1.75 ± 0.42
C*	1.89	162.26	33.28	4.06	9.29	85.53	17.54	1.24

Una vez determinada la existencia de ácidos clorogénicos en los extractos, se evaluó su incidencia sobre el crecimiento de las bacterias escogidas y clasificadas en dos grupos: deterioro y/o patógenas (DP) y asociadas a biota intestinal (ABI). Para *E. coli* ATCC 35150, *Salmonella* sp. ATCC 13311, *Alcaligenes* UCR 277 y *Pseudomonas* ATCC 27853 no se observó ningún efecto cuando se enfrentaron al extracto. Por el contrario, para los microorganismos *B. cereus* ATCC 14579, *L. monocytogenes* SLCC 4013, *S. aureus* ATCC 25923 y *M. luteus* ATCC 4698, todos Gram-positivos, sí fue posible percibir inhibición de su crecimiento (Cuadro 6).

El más susceptible de este grupo bacteriano resultó ser *B. cereus*, seguido por *M. luteus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* (figura 10). Se determinó que a concentraciones de 50 mg/ml de extracto (concentración alta, nivel 3 en cuadro 5) *B. cereus* fue inhibido en todos los casos (A,

B y C). Conforme disminuye la concentración del extracto (niveles 2 y 1 en Cuadro 5), el efecto inhibitorio es menos constante. También es posible observar que al disminuir la concentración de bacterias el fenómeno inhibitorio es más regular. Es decir, parece haber una relación inversa entre concentración de bacterias y efecto inhibitorio, en donde a menor concentración bacteriana mayor inhibición ocurre por parte del extracto. En el caso de *S. aureus*, el microorganismo menos sensible de este grupo se puede observar cómo ningún extracto en concentraciones media o bajo tuvo efecto inhibitorio. El extracto C en todas las concentraciones no logra inhibir el crecimiento de *M. luteus* cuando este está presente en cantidades de 10^8 UFC/ml. No obstante, a menores cantidades de bacteria ($10^7 - 10^5$ UFC/ml) el extracto C sí resulta inhibitorio. En el caso de *L. monocytogenes*, el extracto C sólo logra inhibirla cuando la cantidad de bacterias es de 10^6 UFC/ml o menos (Cuadro 6).

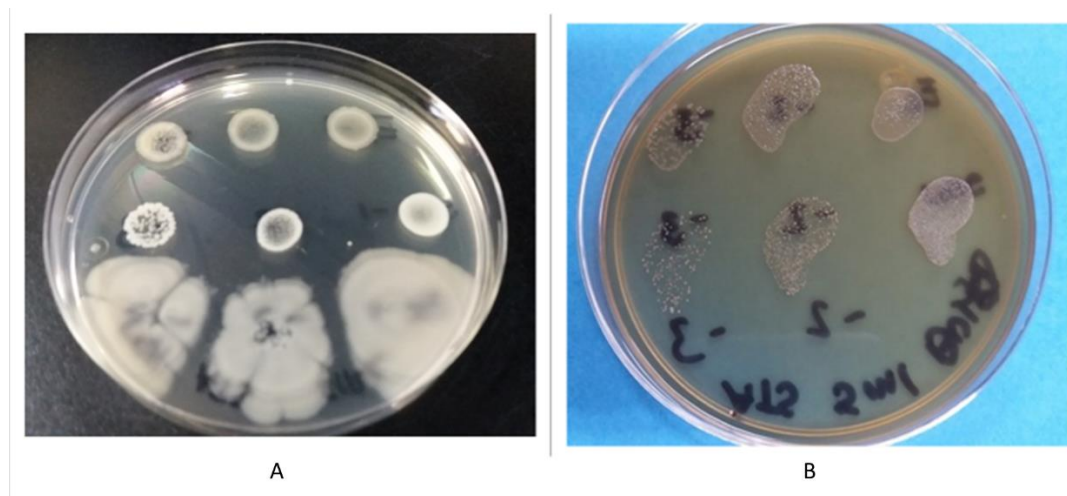


Figura 10: Inhibición de crecimiento *B. cereus* en presencia de extracto de mucílago. A: control de crecimiento placa sin extracto de mucílago. B: Inhibición de crecimiento *B. cereus* placa con extracto de mucílago

Cuadro 6. Comparación del efecto de diferentes concentraciones de extracto de mucílago de café sobre diferentes concentraciones de bacterias PD

		<i>B. cereus</i> ATCC 14579																							
Concentración de extracto	0																								
	1																								
	2																								
	3																								
Repeticiones beneficioso		A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Densidad poblacional		10^8 UFC/g				10^7 UFC/g				10^6 UFC/g				10^5 UFC/g											
		<i>L. monocytogenes</i> SLCC 4013																							
Concentración de extracto	0																								
	1																								
	2																								
	3																								
Repeticiones beneficioso		A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Densidad poblacional		10^8 UFC/g				10^7 UFC/g				10^6 UFC/g				10^5 UFC/g											
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923																							
Concentración de extracto	0																								
	1																								
	2																								
	3																								
Repeticiones beneficioso		A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Densidad poblacional		10^8 UFC/g				10^7 UFC/g				10^6 UFC/g				10^5 UFC/g											
		<i>M. luteus</i> ATCC 4698																							
Concentración de extracto	0																								
	1																								
	2																								
	3																								
Repeticiones beneficioso		A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Densidad poblacional		10^8 UFC/g				10^7 UFC/g				10^6 UFC/g				10^5 UFC/g											

3=concentración alta (50.4 mg/ml), 2= concentración media (26.2 mg/ml), 1= concentración baja (6,7 mg/ml), 0= sin extracto. Las celdas rellenas indican inhibición de crecimiento

El crecimiento de las bacterias ABI (*L. casei*, CRL431 *L. acidophilus* CRL730 *L. plantarum* ATCC 14917 y *L. rhamnosus* ATCC 7469) se vio poco afectado por el extracto de mucílago. *L. casei* fue el más sensible de estos microorganismos; no obstante, el nivel de inhibición obtenido para esta bacteria no es comparable al observado para *B. cereus* (Cuadro 6). Para los otros 3 microorganismos se observó que el extracto A no logró inhibir su crecimiento en ninguna concentración, mientras que el extracto B en sus concentraciones alta y media si lo logró (Cuadro 7).

Cuadro 7: Comparación del efecto de diferentes concentraciones de extracto de mucílago de café sobre diferentes concentraciones de bacterias ABI

<i>L. casei</i> CLR 431																									
Concentración de extracto	0																								
	1																								
	2																								
	3																								
Repeticiones beneficioso		A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Densidad poblacional		10 ⁸ UFC/g				10 ⁷ UFC/g				10 ⁶ UFC/g				10 ⁵ UFC/g											
<i>L. acidophilus</i> CLR730																									
Concentración de extracto	0																								
	1																								
	2																								
	3																								
Repeticiones beneficioso		A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Densidad poblacional		10 ⁸ UFC/g				10 ⁷ UFC/g				10 ⁶ UFC/g				10 ⁵ UFC/g											
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917																									
Concentración de extracto	0																								
	1																								
	2																								
	3																								
Repeticiones beneficioso		A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Densidad poblacional		10 ⁸ UFC/g				10 ⁷ UFC/g				10 ⁶ UFC/g				10 ⁵ UFC/g											
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469																									
Concentración de extracto	0																								
	1																								
	2																								
	3																								
Repeticiones beneficioso		A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Densidad poblacional		10 ⁸ UFC/g				10 ⁷ UFC/g				10 ⁶ UFC/g				10 ⁵ UFC/g											

3=concentración alta (50.4 mg/ml), 2= concentración media (26.2 mg/ml), 1= concentración baja (6,7 mg/ml), 0= sin extracto. Las celdas rellenas indican inhibición de crecimiento

Para determinar si las diferencias encontradas en cuanto a la inhibición del crecimiento en las bacterias DP y las ABI son significativas, se utilizó un modelo regresión logística. El análisis realizado determinó que las bacterias ABI se ven menos afectadas por el extracto (al menos 4.74 veces), que las bacterias DP (95% de confianza, usando LRT, ver Anexo 1).

Se estableció que el efecto del extracto sobre el crecimiento de los microorganismos analizados es proporcional a su concentración. Así, al usar el extracto en baja concentración, el crecimiento microbiano es 5.11 veces menos proclive que cuando se usa el extracto en alta concentración (Cuadros 3 y 5). Esto se vio para una alta densidad poblacional de bacterias (10^8 UFC) y, conforme disminuye esta cifra, el efecto inhibitorio parece ser más pronunciado.

Se determinó de manera clara que el extracto de mucílago inhibe el crecimiento de algunas bacterias, esto en concordancia tanto con la concentración del mismo, como con la densidad poblacional del microorganismo. No obstante, en este punto, no es claro si este efecto es consecuencia de la presencia de ácidos clorogénicos o de cafeína, ya que estas resultaron ser las sustancias más abundantes en el extracto. Por tanto, se procedió a descartar que el efecto del extracto sobre el crecimiento bacteriano se debiera a la presencia de cafeína. Para esto, se prepararon placas de agar tripticasa de soya y MRS con una concentración de cafeína de 7.02 mg/ml, ya que es la concentración más alta presente en los extractos analizados. Densidades poblacionales de 10^8 hasta 10^5 UFC/ml de *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes* fueron capaces de crecer en presencia de 7.02 mg/ml de cafeína, por lo que se concluyó que ni el extracto de mucílago de café ni la cafeína inciden en su crecimiento. Sin embargo, tal y como se muestra en la tabla 8, para *B. cereus* y *L. monocytogenes* el extracto resultó inhibitorio, mientras que la cafeína en la concentración usada no. Caso contrario ocurrió con *E. coli*, que logró crecer en presencia del extracto, pero no de cafeína. Bacterias como *S. aureus*, *M. luteus* y *L. casei* se vieron afectadas tanto por el extracto como por la cafeína.

Cuadro 8. Comparación del efecto del extracto de mucílago (61.8 mg/ml) y de cafeína (7.02 mg/ml) sobre el crecimiento de diversas bacterias

Densidad poblacional UFC/ml	Extracto					Cafeína				
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	0	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	0
<i>B. cereus</i> ATCC 14579										
<i>L. monocytogenes</i> SLCC 4013										
<i>S. aureus</i> ATCC 25923										
<i>M. luteus</i> ATCC4698										
<i>E. coli</i> ATCC 35150										
<i>L. casei</i> CLR 431										
<i>L. acidophilus</i> CLR 730										
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917										
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469										

Extracto=C1 y C2. Cafeína=7.02 mg/ml, control=medio de cultivo sin extracto y sin cafeína. Las celdas rellenas indican inhibición del crecimiento

Una vez establecido que, la inhibición del crecimiento de *B. cereus* por parte del extracto de mucílago no es debida a la presencia de cafeína, se realizó una prueba con el propósito de establecer de manera cuantitativa qué tanto el extracto, en su mayor concentración, inhibe el crecimiento de *B. cereus*, que fue el microorganismo que mostró mayor susceptibilidad. A las 6 horas de contacto del extracto con una suspensión de *B. cereus* ajustada a 3.0×10^6 UFC/ml, la disminución de la población fue de 3 logaritmos (Figura 10). Lo cual es aceptable en la evaluación de eficacia de jabones y desinfectantes.

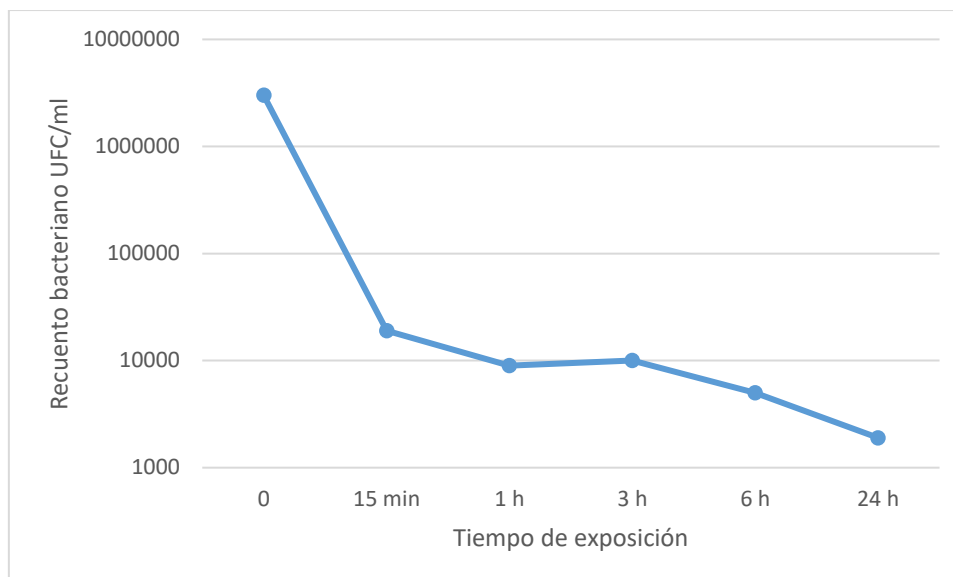


Figura 11. Disminución de una población de *B. cereus* en presencia de un extracto de mucílago de café que contiene 0.8 g/ml).

Discusión

Al inicio de esta investigación se planteó como hipótesis que el mucílago de café contiene compuestos fenólicos con capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Mediante el análisis de HPLC fue posible determinar que realmente el extracto obtenido tiene importantes cantidades de cafeína, en promedio 3.16 mg/ml, y una mezcla de polifenoles donde los ácidos clorogénicos son abundantes (3.83 mg/ml) (Tabla 5).

Este extracto mostró efecto antibacteriano logrando inhibir “*in vitro*” el crecimiento de *B. cereus*, y en menor medida el crecimiento de *M. luteus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Tabla 6). El análisis estadístico de los datos mostró que este efecto es dosis dependiente, es decir, a mayor concentración del extracto mayor inhibición del microorganismo. Las bacterias AFI no mostraron mayor afectación en presencia del extracto, tal y como lo reportan también Pacheco-Ordaz *et al.* (2017) utilizando compuestos fenólicos presentes en la fruta de mango.

El extracto de mucílago no tuvo actividad alguna contra bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, *Salmonella* o *Pseudomonas*. Varios son los reportes asociados a diferentes matrices de café (productos derivados del procesamiento del fruto, bebida o derivados de esta) que indican que extractos de ellas poseen actividad contra microorganismos potencialmente patógenos (Khochapong *et al.*, 2021, Duangjai *et al.*, 2016, Monente *et al.*, 2015; Suarez-Quirós *et al.*, 2013a; Suarez-Quirós, *et al.*, 2013b; Martínez-Tomé *et al.*, 2011). En todos estos reportes, las bacterias Gram-negativas son menos afectadas que las Gram-positivas (Chan *et al.*, 2018; Monente *et al.*, 2015). Al parecer, esa observación está estrechamente relacionada con la presencia o no de membrana externa en las bacterias (Chan *et al.*, 2018; Runti *et al.*, 2015; Cueva *et al.*, 2010). La conformación de la pared de los microorganismos Gram-negativos comprende la presencia de una membrana externa hidrofílica, que en apariencia actúa como una barrera que imposibilita la acción de los componentes activos (diversos compuestos fenólicos) (Chan *et al.*, 2018) presentes en las diferentes matrices de café. Por su parte, las bacterias Gram-positivas carecen de dicha barrera (figura 12) y se teoriza, entonces, que los ácidos fenólicos de la bebida de café, granos o subproductos del procesado del fruto, al ser de bajo peso molecular y tener formas disociadas, pueden difundir a través de la membrana citoplasmática al citoplasma bacteriano acidificándolo y, en algunas ocasiones, causando la muerte de la célula bacteriana (Kumar *et al.*, 2019; Guil-Guerrero *et al.*, 2016; Cueva *et al.*, 2010). Se sabe que tanto el valor de la pKa de los ácidos clorogénicos, así como su lipofilicidad, son factores clave que van a determinar su solubilidad en la membrana citoplasmática y su paso a través de ella para ejercer su capacidad antimicrobiana. Se ha observado también que una disminución en los dobles enlaces de los ácidos hidroxicinámicos genera a su vez una disminución en su actividad antimicrobiana (Kumar *et al.*, 2019; Sánchez-Maldonado *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos, independientemente de su origen, tienen

la capacidad de modificar la permeabilidad de la membrana celular y la rigidez de la pared celular. Estos cambios conllevan a variaciones en la interacción de ambas y a la pérdida de su integridad, lo cual genera daños irreversibles en la membrana citoplasmática e incluso coagulación de contenido celular, provocando la muerte del microorganismo (Khochapong *et al.*, 2021). En general, los compuestos fenólicos presentan en su estructura química grupos hidroxilo (OH) que tienen la capacidad de deslocalizar electrones, los cuáles pueden actuar intercambiando protones. Esto reduce el gradiente de la membrana citoplasmática de la célula procariota, causando el colapso de la fuerza protón-motriz y el agotamiento de la reserva de ATP; ambos fenómenos contribuyen a la muerte celular (Gyawali & Ibrahim, 2014).

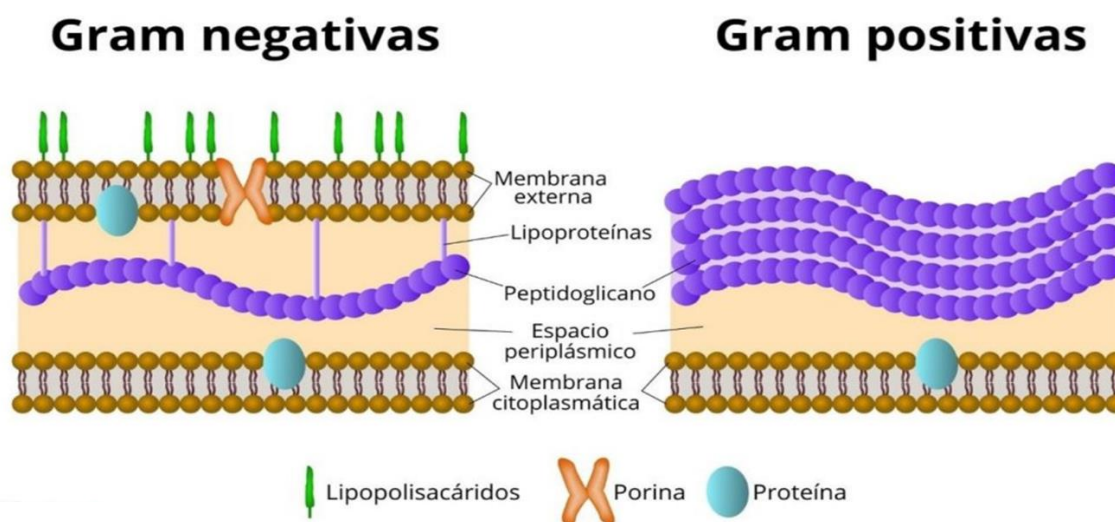


Figura 12. Estructura pared bacteriana. Tomado de <https://www.lifeder.com/pared-celular/>

Diferentes reportes informan que extractos de la bebida de café (Martínez-Tomé *et al.*, 2011) del “spent coffee” (desecho que queda luego de hacer la bebida de café) (Monente *et al.*, 2015) y de la pulpa de café (Khochapong *et al.*, 2021, Duangjai *et al.*, 2016), son capaces de incidir en el crecimiento de diversas bacterias. La mayoría de ellos, para evidenciar esta capacidad antimicrobiana, utilizan la técnica de difusión en agar. Por ejemplo, Duangjai *et al.* (2016), a

partir de extractos de pulpa de café, describen halos de inhibición de 12 y 16 mm para *S. aureus* y *S. epidermidis*, respectivamente. A partir de extractos de la bebida de café y de “spent coffee”, Monente *et al.* (2015) reportan halos de 17 y 15 mm de inhibición de crecimiento de *S. aureus* y 20 y 19 mm para *L. monocytogenes*. No obstante, al no existir un halo de corte o referencia para comparar estos compuestos en particular, los resultados de estos autores no son concluyentes. Por esta razón, durante la investigación se prefirió utilizar la metodología de macrodilución en agar para, de esta manera, obtener un dato binario de crecimiento o no crecimiento en presencia de diferentes concentraciones del extracto. Esta puede ser la razón por la cual algunos investigadores (Martínez-Tomé *et al.*, 2011) reportan halos de inhibición para bacterias Gram-negativas, mientras que el extracto obtenido a partir de mucílago no logró inhibir, en ningún caso, su crecimiento. Adicional a esto, hay que tener en cuenta que el café tostado, utilizado para obtener los extractos de la bebida y del “spent coffee”, posee, además de una mezcla compleja de ácidos clorogénicos, trigonellina y cafeína, compuestos de la reacción de Maillard, como las melanoidinas, con reconocida capacidad antimicrobiana debida principalmente a mecanismos de quelación de iones, mayoritariamente hierro y magnesio (Hu *et al.*, 2019; Ruffian-Henares *et al.*, 2009). En el mucílago de café y la pulpa, las melanoidinas no están presentes. Otra razón de la no concordancia de datos observada, además de la ya mencionada diferencia en la pared bacteriana, podría ser la concentración del extracto utilizado (50 mg/ml). Por ejemplo, para la inhibición de *Pseudomonas* se requiere una concentración de 75 mg/ml de un extracto de pulpa de café (Duangjai, *et al.*, 2016) u 80 mg/ml de un extracto de “spent coffee” (Monente *et al.*, 2015).

De los organismos Gram-positivos estudiados, *B. cereus* resultó ser el más sensible al extracto. Fei *et al.* (2018) reportaron haber inhibido el crecimiento de este microorganismo, tanto en

solución salina como en leche pasteurizada, cuando le adicionaron un extracto polifenólico de aceite de oliva. Los autores reportaron una concentración mínima inhibitoria del extracto polifenólico de aceite de oliva para *B. cereus* de 0.6 mg/ml, ligeramente mayor al obtenido en este estudio (0.5 mg/ml). Este grupo también reportó haber obtenido disminuciones de crecimiento de 8 logaritmos luego de 5 horas de incubación en solución salina y luego de 10 horas en leche pasteurizada al usar concentraciones de 0.6 mg/ml. Esto es más efectivo que los tres logaritmos de disminución observados en este estudio, a pesar de usar concentraciones de extracto muy similares. Esta diferencia podría deberse al efecto del pH de los extractos utilizados. Así, mientras el estudio de Fei *et al.*, (2018) no indica el valor final de pH de su extracto, el presente fue de 6 y *B. cereus* crece en un rango de pH entre 4,9 y 9,3 (Forsythe 2010). De hecho, se observa diferencia (Fei *et al.*, 2018) en el tiempo para lograr una disminución de 8 log, 5 h en solución salina y 8 h en leche pasteurizada para obtener una disminución de la misma magnitud. El sistema buffer de la leche, entre otras cosas, hace que el efecto de inhibición debida a pH se vea demorado. Al usar un pH final de 6 es posible que el efecto inhibitorio se vea disminuido, es decir la disminución de crecimiento de *B. cereus* será mayor a pH bajos y no se obtendrá crecimiento por debajo de un pH de 4.5. De hecho, al utilizar el extracto rico en polifenoles proveniente del mucílago de café sin ajustar el pH (pH cercano a 4), con una incubación de 15 minutos se obtuvo una disminución de 6 log (datos no mostrados). No obstante, al neutralizar el pH del extracto hasta un valor de 6 se logró una disminución de tres logaritmos, lo cual es aceptable en la evaluación de eficacia de jabones y desinfectantes (González, 2016). El inconveniente en este caso es el prolongado tiempo de contacto (mínimo 6 h) para alcanzar una reducción logarítmica considerada como satisfactoria. Por tanto, no se recomendaría incorporar el extracto en desinfectantes o jabones, que idealmente deben tener tiempos de contacto cortos con el usuario (10-15 min). Sin

embargo, sería interesante hacer pruebas de toxicidad que permitan considerar la posibilidad de incorporar este extracto en sistemas alimentarios, empaques inteligentes o en productos cosméticos, como se plantea, también, en investigaciones publicadas recientemente (Khochapong *et al.*, 2021; Fernandes *et al.*, 2021; Olszewska *et al.*, 2020; Rashmi & Negi 2020).

De acuerdo con el análisis estadístico realizado, el extracto probado inhibió el crecimiento en mayor o menor medida de *B. cereus*, *M. luteus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* -todos microorganismos Gram-positivos-. No obstante, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus*, también bacterias Gram-positivas, no tuvieron la misma afectación. De hecho, se determinó con un 95% de confianza, que las bacterias ABI se ven menos afectadas (al menos 4.74 veces), en presencia de extracto que las bacterias PD. La menor sensibilidad al extracto mostrada por las bacterias ABI podría deberse a que estas, durante su metabolismo fermentativo, producen diversos ácidos orgánicos, despendiendo de si son homo o hetero fermentadoras (Endo & Dicks, 2014). Independientemente de la vía metabólica que desarrollen, la producción de estos ácidos las ha adaptado a ambientes de bajo pH, creciendo en rangos que van desde 4.8 a 9.6, con un óptimo cercano a 4 (Jay, 2000). El extracto proveniente del mucílago tiene un pH de 4.3-4.4 lo cual es cercano al pH óptimo de crecimiento de las bacterias ABI; sin embargo, las placas utilizadas en el experimento siempre tuvieron un pH final entre 5 y 6 dependiendo de la cantidad de extracto agregada. Es decir, las ABI siempre estuvieron en un rango de pH por encima de su óptimo (4) y, a pesar de ello, su crecimiento se vio poco afectado, tanto por el pH como por la presencia del extracto de mucílago.

Las ABI poseen una pared bacteriana de conformación Gram-positiva (sin membrana externa), lo que sería indicativo de mayor sensibilidad a la acción de los polifenoles; no obstante, expresan un mecanismo que les permite mantener un pH interno mayor al del medio externo. Por ejemplo, *L. casei* es capaz de desarrollarse en ambientes de pH 3.8 manteniendo un pH interno de entre 5.1 y 6.4 (Nannen & Hutkins, 1991). Esto lo logra generando cambios que permiten aumentar la fluidez de su membrana incrementando el contenido de ácidos grasos insaturados en la doble capa lipídica (Campos *et al.*, 2009). Adicionalmente, se sabe que algunas ABI poseen enzimas específicas (β -glucuronidasas, β -galactosidasas y α -rhamnosidasas) que les permiten metabolizar compuestos fenólicos utilizándolos como fuente de carbono. Algunos *Lactobacillus*, gracias a sus enzimas (galato descarboxilasa), son capaces de degradar el ácido gálico a pirogalol. Este compuesto es degradado a cis-aconitato y así entra al ciclo de Krebs, permitiéndole a estos microorganismos seguir metabólicamente activos (Pacheco-Ordaz *et al.*, 2017; Sánchez-Maldonado *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2009). Esta capacidad de regular su pH interno de manera independiente al externo, aunado a la presencia de enzimas capaces de metabolizar compuestos fenólicos, podrían permitir a las ABI mantener su viabilidad en presencia del extracto de mucílago de café.

La selectividad mostrada por el extracto en cuanto a inhibición de crecimiento de bacterias Gram-positivas representa una gran ventaja. Eventualmente, se podría usar el extracto como biopreservante en productos fermentados para aumentar la inocuidad del producto (inhibiendo *B. cereus*) sin alterar su ecosistema fermentativo (Gemechu, 2020).

Es importante considerar que el extracto utilizado tiene una mezcla de compuestos (Figura 9), con un predominio de cafeína y ácidos clorogénicos. En primera instancia se postuló que la

cafeína podría ser responsable del efecto inhibitorio observado; no obstante, los datos obtenidos descartaron que este compuesto sea el responsable de la inhibición de crecimiento de *B. cereus* (Tabla 7). Otros investigadores (Runti *et al.*, 2015) ya han reportado eficacias similares para extractos de café regular y descafeinado para diversas bacterias, lo que demuestra que el potencial antimicrobiano no reside en la cantidad de cafeína que pueda tener un extracto. A pesar de esto, es bien sabido que la cafeína tiene capacidad de inhibir la síntesis proteica en bacterias y que también genera daño a nivel del ADN (Ibrahim *et al.*, 2006), Se requieren concentraciones mayores a 200 mg/ml para inhibir bacterias como *E. coli* y *S. aureus* (Kamgang *et al.*, 2020), lo cual es bastante superior al contenido de cafeína encontrado en el extracto de mucílago de café (6.48 mg/ml).

Si bien es cierto, se descartó el efecto de la cafeína sobre el crecimiento de las bacterias Gram-positivas usadas, la inhibición de crecimiento observada para *B. cereus* puede no ser debida únicamente a los ácidos clorogénicos presentes en el extracto. La metodología de extracción utilizada podría permitir la presencia de otros compuestos fenólicos que estarían participando en la inhibición del crecimiento. Recientemente Esquivel *et al.* (2020) lograron identificar, en pulpa y piel de frutos de café Arábica, 16 diferentes compuestos fenólicos. Muchos de ellos probablemente se encuentren también en el extracto de mucílago. De esos 16 compuestos reportados por Esquivel *et al.* (2020), nueve fueron identificados como ácidos clorogénicos. La técnica utilizada en la presente investigación permitió determinar la presencia de estos compuestos como grupo en el extracto analizado; sin embargo, la sensibilidad de la técnica y la falta de patrones de los diferentes ácidos clorogénicos no permiten la resolución de ese pico para identificar la naturaleza de sus subcomponentes.

Esquivel *et al.* (2020) lograron determinar la presencia de mangiferina en pulpa y cáscaras de café de diferentes colores. Este compuesto ya había sido reportado como presente en las hojas de la planta de café (Septiana *et al.*, 2020), pero no en el fruto. La mangiferina es un galotanino hidrolizable presente en varias partes de la planta y el fruto del mango (*Mangifera indica L.*). Se ha descrito que tiene propiedades antivirales, anticancerígenas, inmunomoduladoras, antidiabéticas, antioxidativas, analgésicas y hepatoprotectoras (Imran *et al.*, 2017); su actividad antimicrobiana es mayor sobre las bacterias Gram-positivas y parece relacionarse con su función análoga a la de los sideróforos (Imran *et al.*, 2017; Engels *et al.*, 2011). En este sentido, las bacterias ABI tendrían ventaja ante este compuesto y serían resistentes debido a que su metabolismo puede llevarse a cabo en ausencia de iones hierro (Bruyneel *et al.*, 1989), otra razón que explicaría la sobrevivencia de las ABI al extracto de mucílago, no así *B. cereus*.

Conclusiones y recomendaciones

El extracto rico en polifenoles obtenido a partir de mucílago de café tiene la capacidad de incidir en el crecimiento bacteriano por un mecanismo dosis-dependiente. Este efecto es más evidente en las bacterias Gram-positivas; no obstante, es selectivo, ya que no todos los microorganismos Gram-positivos usados en el estudio fueron afectados de igual forma. Del grupo de bacterias DP, *B. cereus* resultó ser el más sensible, mientras que las ABI no tuvieron mayor afectación. Al mostrar un carácter selectivo de inhibición, este extracto podría ser de utilidad en sistemas alimentarios, ya sea como biopreservante añadido propiamente al alimento o como conservante incorporándolo en diversos materiales utilizados para la producción de empaques inteligentes, claro está que deben realizarse pruebas de toxicidad y

sensoriales para determinar su utilidad. Algunas investigaciones han hecho avances en este sentido (Iriando *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2015), e informan que extractos de “silver skin” no muestran toxicidad para líneas celulares de fibroblastos siempre que las concentraciones no sean superiores a los 1000 mg/ml (Rodrigues *et al.*, 2015). También se reporta que, en ratas hembra adultas, una dosis oral de 2000 mg/kg de peso corporal de extractos de pergamino, cáscaras de café y “silver skin” no generó signos visibles de toxicidad, comportamiento anormal o mortalidad (Iriando *et al.*, 2019). Sería importante establecer el nivel de toxicidad que puede mostrar el extracto de mucílago teniendo en cuenta que, al ser éste un subproducto obtenido antes del proceso de tostado, la posibilidad de presencia de acrilamida, catalogada como agente cancerígeno, es muy baja. Es importante también establecer si este extracto puede contener cantidades importantes de micotoxinas. Todos estos aspectos deben ser evaluados cuidadosamente para proyectar la utilización del mismo en sistemas alimentarios.

Otro aspecto importante por considerar es el eventual carácter prebiótico que pueda tener el extracto de mucílago. En los últimos años se ha realizado investigación considerable en el tema de los alimentos funcionales y en esta línea de investigación los compuestos con carácter prebiótico han sido de interés. Aparentemente, la relación biota intestinal-compuestos fenólicos podría enmarcarse en este ámbito. Los compuestos fenólicos, como tal, normalmente se encuentran glicosilados y son moléculas relativamente complejas, por lo que no pueden ser absorbidos a nivel intestinal (Tomás-Barberán & Espin 2019; Pacheco-Ordaz *et al.*, 2017). Se ha reportado que algunas bacterias como *E. coli*, *B. lactis* y *L. gasseri* poseen actividad esterasa acil-quínica Clifford *et al.*, 2020) y otras bacterias asociadas a la biota intestinal humana poseen diferentes enzimas capaces de catabolizar los compuestos fenólicos (Pacheco-Ordaz *et al.*, 2017). El efecto del metabolismo bacteriano sobre los compuestos

fenólicos hace posible la transformación de estos en compuestos que pueden ser absorbidos en el intestino delgado, los cuales generan diversos beneficios al consumidor (Pacheco-Ordaz *et al.*, 2017). Por tanto, al existir compuestos fenólicos en el mucílago de café, y teniendo en cuenta que estos compuestos no afectan bacterias relacionadas con la biota intestinal, sería importante evaluar el potencial prebiótico de este subproducto del café, ya que no sólo podría actuar como conservante, inhibiendo el crecimiento de ciertos microorganismos patógenos y de deterioro, sino que también permitiría la coexistencia de microorganismos con potencial probiótico en el sistema alimentario.

En un ámbito no directamente relacionado con los alimentos, el extracto de mucílago utilizado en esta investigación demostró tener actividad inhibitoria contra *B. cereus*, logrando reducir una población de 10^6 UFC/ml a 10^3 UFC/ml en 6 horas. Esto cuando el pH del extracto fue mantenido cercano a 6. No obstante, si se utiliza el pH original del extracto (4.4) se puede lograr una reducción de 6 logaritmos en un tiempo de 15 minutos. Por tanto, si fuese posible incorporar el extracto en soluciones desinfectantes con el pH original el efecto se potencia y podría usarse en sistemas de desinfección que requieran cortos tiempos de contacto.

Para llegar a cualquier posible aplicación biotecnológica del extracto de mucílago, se recomienda optimizar el proceso de extracción y profundizar en su caracterización. Es importante definir a qué compuestos fenólicos se debe el efecto inhibitorio observado. De igual forma, es necesario ahondar en el mecanismo por el cual se da la inhibición reportada y determinar el papel que pueda jugar sobre la esporulación de *B. cereus*.

El mucílago de café es un sustrato al que se le da poca utilidad; sin embargo, la descripción de ácidos clorogénicos, y probablemente algunos otros compuestos fenólicos presentes en él, puede contribuir para que la industria explote todo el potencial de este subproducto.

Referencias

- Adams, M. & Ghaly, A. 2007. Maximizing sustainability of the Costa Rican coffee industry. *Journal of Cleaner Production*, 15, 1716-1729.
- Almeida, A.A., A. Farah, D.A. Silva, E.A. Nunan, and M.B. Gloria. 2006. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54:8738-874.
- Almeida, A.A.P., Naghetini, C., Santos, V., Antonio, A., Farah, A., Glória, M. 2012. Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. *Food Research International*, 49, 459–461.
- Alves, R. Rodrigues, F., Nunes, M., Vinha, A., Oliveira, M. 2017. State of the art in coffee processing by products. *Handbook of coffee Processing by products*. Chapter 1. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811290-8.00008-6>.
- Angeloni, G., Guerrini, L., Masella, P., Bellumori, M., Daluiso, S., Parenti, A., Innocenti, M. 2019. What kind of coffee do you drink? An investigation on effects of eight different extraction methods. *Food Research International* ,116, 1327-1335.
- Antonio, A., Iorio, N., Pierro, Candreva, M., Farah, A., dos Santos, K., Maia, L. 2011. Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Archives of oral biology*, 56, 556-567.
- Aydin, S. & Caniklioglu, A. 2021. Antimicrobial and antioxidant potentials, total phenolic contents of some herbal waters. *European Journal of Biological Research*, 11 (2): 203-211.

- Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., Fazel, S., Mohammad, S. 2017. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological, Research*, 196, 44-68.
- Basar, B. & Sanlier, N. 2019. Coffee consumption and disease correlations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59. 2, 336-348.
- Brigitta, E., T. Bencsik, and N. Papp. 2016. Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Asian Pacific Journal Tropical Medicine*, 9:1127-1135.
- Bruyneel, B., vande Woestyne, M. & Verstraete, W. 1989. Lactic acid bacteria: Micro-organisms able to grow in the absence of available iron and copper. *Biotechnol Lett*, 11, 401–406.
- Budryn, G., Nebesny, E., Pałecz, B., Rachwał-Rosiak, D., Hodurek, P., Miśkiewicz, K., Oracz, J., Żyżelewicz, D. 2014. Inclusion complexes of β -cyclodextrin with chlorogenic acids (CHAs) from crude and purified aqueous extracts of green Robusta coffee beans (*Coffea canephora* L.) *Food Research International*, 61; 202-213.
- Butt, M.S., and M.T. Sultan. 2011. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, 51:363-373.
- Castaldo, L., Narváez, A., Izzo, L., Graziani, G., Ritieni, A. 2020. In Vitro Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Coffee Silverskin Polyphenolic Extract and Characterization of Bioactive Compounds Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Molecules*, 25, 2132.
- Campos, F. M., Couto, J.A., Figueiredo, I. V. Rangel, I.V., Hogg, T.A. 2009. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 144–151.

- Chan, C., Gan, R., Shah, N., Corke, H. 2018. Polyphenols from selected dietary spices and medicinal herbs differentially affect common food-borne pathogenic bacteria and lactic acid bacteria. *Food Control* 92, 437–443.
- Clifford, M., Jaganath, I., Ludwing, I., Crozier, A. 2017. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*, 34, 1391.
- Clifford, M., Kerimi, A., Williamson, G. 2020. Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids (acyl-quinic acids) in humans. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 1299-1352.
- Crozier T.W., Stalmach, A., Lean, M.E., Crozier, A. 2012. Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. *Food Function*, 3, 1: 30-3.
- Cueva, C., Moreno, V., Martín, P., Bills, G., Vicente, M., Basilio, A., López, C., Requena, T., Rodríguez, J., Bartolomé, B. 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161, 372-382.
- Daglia, M., A. Papetti, P. Grisoli, C. Aceti, V. Spini, C. Dacarro, and G. Gazzani. 2007. Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55:10208-10213.
- Dorsey, B & Jones, M. 2017. Healthy components of coffee processing by-products. *Handbook of coffee Processing by products*. Chapter 2. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811290-8.00008-6>
- Duangjai, A., Suphrom, N., Wungrath, J., Ontawong, A., Nuengchamnong, N., Yosboonruang, A. 2016. Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integrative Medicine Research*, 5, 324-331.

- Dutra da Silva, B., Campos, P., Fontes, P., Fantuzzi, E., Domenici, C. 2021. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, 176, 108463.
- Echeverria M. C. & Nuti M. 2017. Valorisation of the residues of coffee agro-industry: perspectives and limitations. *Open Waste Management Journal*, 10, 13-22.
- Engels, C., Schieber, a., Ganzle, M. 2011. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica L.*). *Applied and Environmental Microbiology*, 77; 7: 2215–2223.
- Endo A, Dicks LMT: Physiology of the LAB. 2014. In lactic acid Bacteria: biodiversity and taxonomy. Edited by Holzapfel WH, Wood BJB. Wiley Blackwell, 13-30.
- Esquivel, P., and V. Jiménez. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*. 46:488-495.
- Esquivel, P., Viñas, M., Steingass, C., Gruschwitz, M., Guevara, E., Carle, R., Schweiggert, R., Jiménez, V. 2020. Coffee (*Coffea arabica L.*) by-Products as a Source of Carotenoids and Phenolic Compounds-Evaluation of Varieties with Different Peel Color. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4: 590597.
- Fei, P., Xu, Y., Zhao, S., Gong, S., Guo, L. 2019. Olive oil polyphenol extract inhibits vegetative cells of *Bacillus cereus* isolated from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 102: 3894-3902.
- Fernández de Araújo, F., Farias, D., Neri-Numa, I., Pastore, G. 2021. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 127535.

- Forsythe, S. J. *The microbiology of safe food*. 2010. (2nd ed., pp. 71). New York: Blackwell Publishing Ltd.
- Gemechu, G. F. 2020. Embracing nutritional qualities, biological activities and technological properties of coffee byproducts in functional food formulation. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 235–261.
- Ghosh P. & Venkatachalapathy N. 2014. Processing and drying of coffee – a review. *International Journal of Engineering Research & Technology*, 3: 12, 784-784.
- Gokce, B & Sanlier, N. 2019. Coffee consumption and disease correlations. *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, 59; 2, 236-348.
- González, P. 2016. Guía general para la realización y presentación de ensayos de eficacia de productos desinfectantes y sanitizantes de uso sanitario y doméstico. Instituto de Salud Pública. Chile.
- Guardia, Y. 2012. Estudio de la digestión anaerobia en dos fases para el tratamiento de las aguas residuales de despulpe del beneficiado húmedo del café. Tesis doctoral Universidad Técnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.
- Guil-Guerrero, J. L. Ramos, L., Moreno, C., Zuñiga-Paredes, J. C., Carlosama-Yepes, M., Ruales, P. 2016. Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. *Livestock Science*, 189, 32–49.
- Gutiérrez, A. 2002. Café antioxidantes y protección a la salud. *MEDISAN*, 6 (4):72-81.

- Gyawali, R., and S.A. Ibrahim. 2012. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Applied Microbiology Biotechnology*, 95:29-45.
- Gyawali, R., Ibrahim, S. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.
- Hejna A. 2021. Potential applications of by-products from the coffee industry in polymer technology—current state and perspectives. *Waste Management*, 121, 296–330.
- Herrera, J., Cortina, H., Anthony, F., Prakash, N., Lashermes, P., Gaitán, A., Cristancho, M., Acuña, R. y Lima, D. 2011. Coffee en Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Medicinal Plants, V 6. CRC Press 2011. Pages 589–640. ISBN: 978-1-4200-7386-7.
- Hikichi, S., Andrade, R., Dias, E., Duarte, W. 2017. Biotechnological applications of coffee processing by-products. *Handbook of coffee Processing by products*. Chapter 8. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811290-8.00008-6>
- Hoseini, M., Cocco, S., Casucci, C., Cardelli, V., Corti, G. 2021. Coffee by-products derived resources. A review. *Biomass and Bioenergy*, 148, 106009.
- Hu, G. L., Wang, X., Zhang, L., Qiu, M. 2019. The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. *Food Function*, 10, 3113-3126.
- Ibrahim, S., Salameh, m., Phetsomphou, S., Yang, H., Seo, C. 2006. Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7. *Food Chemistry*, 99; 645–650.
- Imran, M., Arshad, M., Butt, M., Kwon, J., Arhad, M., Sulta, M. 2017. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. *Lipids in Health and Disease*, 16:84.

Instituto del Café de Costa Rica. 2020. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica.

http://www.icafe.cr/wpcontent/uploads/informacion_mercado/informes_actividad/actual/Informe%20Actividad%20Cafetalera.pdf

Iñiguez-Moreno M., Ávila-Novoa, M., Iñiguez-Moreno, E., Guerrero-Medina, P. J., Gutiérrez-

Lomelí, m. 2017. Antimicrobial activity of disinfectants commonly used in the food industry in Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, 143–147.

Iriondo-DeHond; A., Aparicio-García, N., Fernandez-Gomez, B., Guisantes-Batan, E., Velásquez-

Escobar, F., Blanch, G. P., San Andres, M. I., Sanchez-Fortun, S., del Castillo, M.D. 2019. Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 51; 194-204.

Janissen B & Huynh T. 2018. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry

byproducts: A review. *Resources, Conservation & Recycling*, 128, 110–117.

Jay, J., Loessner, J., Golden, D. 2000. *Modern Food Microbiology*. Editorial, Springer, U. S. A. 7ma

ed. ISBN 978-0-387-23413-7.

Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., Ruffian, J. 2015. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic,

antimicrobial and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 12-18.

Kammerer, D., Claus, A. Carle, R., Schieber, A. 2004. Polyphenol screening of pomace from red

and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J AgricFood Chem*, 52, 4360-4367.

Kamgang, F., Angeloni, S., Navarini, L., Angeloni, C., Freschi, M., Hrelia, S., Vitali, L., Sagratini,

G., Vittori, S., Caprioli, G. 2020. Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive

compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Research International*, 1133, 109128.

Khochapong, W., Ketnawa, S., Ogawa, Y., Punbusayakul, N. 2021. Effect of in vitro digestion on bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extract. *Food Chemistry*, 348, 129094.

Kumar, N. & Goel, N. 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370.

Lima, V., Olivera, C., Santos, E., Morais, L. Tintino, S., Freitas, T., Geraldo, Y., Pereira, R., Cruz, R., Menezes, I., Coutinho, H. 2016. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial Pathogenesis*, 99, 56-61.

López, J. C. 2017. Producción de Bio-alcoholes, a partir de mucílago obtenido con tres tecnologías utilizadas en el beneficio ecológico del café. Tesis Universidad de Manizales, Manizales, Caldas.

Loo, Y., Howell, K., Chan, M., Zhang, P., Ng, K. 2020. Modulation of the human gut microbiota by phenolics and phenolic fiber-rich foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19: 1268-1298.

Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., Wang, Z. 2011. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *Journal of Food Science*, 76, 6: 398-403.

Ludwig, I. A, Mena, P., Calani, L., Cid, C., Del Rio, D., Lean, M.E., Crozier, A. 2014. Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: what are we drinking? *Food Function*, 5 (8):1718-26.

- Magoni, C., Bruni, I., Guzzetti, L., Dell'Agli, M., angiovanni, E., Piazza, S., Regonesi, M., Maldini, M., Spezzano, R., Caruso, D., Labr, M. 2018. Valorizing coffee pulp by-products as anti-inflammatory ingredient of food supplements acting on IL-8 release. *Food Research International*, 112, 129–135.
- Manasa, V., Padmanabhan, A., Appaiah, K. A. 2021. Utilization of coffee pulp waste for rapid recovery of pectin and polyphenols for sustainable material recycle. *Waste Management*, 120, 762–771.
- Martínez-Alemán, S. R., Hernández-Castillo, F. D., Aguilar-González, C. N. Rodríguez-Herrera, R. 2019. Extractos de pulpa de café: Una revisión sobre antioxidantes polifenólicos y su actividad antimicrobiana. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 27(77), 73-79.
- Martínez-Tomé, M., A. Jiménez-Monreal, L. García-Jiménez, L. Almela, I. García-Diz, M. Mariscal-Arcas, and M.A. Murcia. 2011. Assessment of antimicrobial activity of coffee brewed in three different ways from different origins. *European Food Research Technology*, 233:497-505.
- Martini, D., C. Del-Bo, M. Tassotti, P. Riso, D. Del-Rio, F. Brighenti, and M. Porrini. 2016. Coffee consumption and oxidative stress: a review of human intervention studies. *Molecules*, 21, 8:979.
- McCarthy, R., and F. O’Gara. 2015. The impact of phytochemicals present in the diet on microbial signalling in the human gut. *Journal of Functional Foods*, 14:684-691.
- McNutt, J. & He, Q., 2019. Spent coffee grounds: A review on current utilization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 71, 78–88.

- Mendes dos Santos, E., Malvezzi, L., Lacalendola, L., Artem, J., Carmargo, G., Alves, R., Oliveira, M., Gava, P. 2021. Coffee by-products in topical formulations: A review Trends in Food Science & Technology, 111, 280–291.
- Mithul Aravind, S., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., & Chakkaravarthi, S. 2021. Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. Food Research International, 142.
- Mingo, E., Silván, J., Martínez, A. 2016. Selective antibacterial effect on *Campylobacter* of a winemaking waste extract (WWE) as a source of active phenolic compounds. LWT-Food Science and Technology, 68, 418-424.
- Monente, C., Bravo, J., Vitas, A., Leire, A., De Peña, M., Cid, C. 2015. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. Journal of Functional Foods, 12, 365–374.
- Morales, D. 2021. Revisión de procesos biológicos para el aprovechamiento de pulpa de café residual. Tesis. Universidad de América, Bogotá Colombia.
- Murthy, P. & Naidu, M. 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. Resources, conservation and recycling, 66; 45– 58.
- Mussatto, I. & Teixeira, J. 2013. Engineering aspects of food biotechnology. CRC Press.
- Nakayama, T., and K. Oishi. 2013. Influence of coffee (*Coffea arabica*) and galacto-oligosaccharide consumption on intestinal microbiota and the host responses. FEMS Microbiology Letters, 343:161-168.

- Nannen, N. & Hutkins, R. 1991. Intracellular pH Effects in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74: 741-746.
- Naik, N., Jagadeesh, k., Alagawadi, A. R. 2007. Microbial decolorization of spentwash: a review. *Indian Journal Microbiology*, 48:41–48.
- Naranjo, M., L.T. Velez, y B.A. Rojano. 2011. Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Revista. Cubana de Plantas Medicinales*, 16:164-173.
- Naveed, M., V. Hejazi, M. Abbas, A. Kamboh, G.J. Khan, M. Shumzaid, F. Ahmas, D. Babazadeh, X. Fang, F. Modarresi-Ghazani, L. WenHua, and Z. XiaoHui. 2018. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97:67-74.
- Olszewska, M., Gedas, A., Simoes, M. 2020. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. *Food Research International*, 134, 109214.
- Pacheco-Ordaz, R., Wall-Medarno, A., Goñi, M. G., Ramos-Clamont-Montfort, G., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A. 2017. Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 66, 25-3.
- Puerta G. I., Ríos, S. 2011. Composición Química del mucílago del café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62 (2): 23-40.
- Rashimi & Negi. 2020. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*, 136, 109298.
- Rathinavelu, R., Graziosi, G. 2005. Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. Organización internacional del café. https://www.ico.org/show_document.asp?id=808

- Rodrigues, F., Palmeira-de-Oliveira, A., Neves, J.d., Sarmiento, B., Amaral, M. H., & Oliveira, M. B. P. P. 2015. Coffee silverskin: A possible valuable cosmetic ingredient. *Pharmaceutical Biology*, 53, 386–394.
- Rufian-Henares, J. A., & de la Cueva, S. P. 2009. Antimicrobial activity of coffee melanoidins-A study of their metal-chelating properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2: 432–438.
- Rufián-Henares, J. & Pastoriza, S. 2015. Biological Effects of Coffee Melanoidins in Coffee in Health and Disease Prevention. Editor: Victor R. Preedy, Academic Press, Pages 853-858, ISBN 9780124095175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00094-2>
- Runti, G., Pacor, S., Coloban, S., Gennaro, R., Navarini, L., Scocchi, M. 2015. Arabica coffee extract shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* and low toxicity towards a human cell line. *LWT - Food Science and Technology* 62, 108-114.
- Sánchez-Maldonado, A. F. Schieber, A., Ganzle, M. G. 2011. Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1176-1184.
- Septiana, I., Nguyen, T., Lim, S., Lee, S., Prk, B., Kwak, S., Park, S., Kim, S., Kim, D. 2020. Enzymatic synthesis and biological characterization of a novel mangiferin glucoside. *Enzyme and Microbial Technology*, 134, 109479.
- Siqueira-Palmeri, M.G., L.T. Cruz, F. Soares-Bertges, H. Moreira-Húngaro, L.R. Batista, S.S. Da-Silva, M.J. Vieira-Fonseca, M. Pereira-Rodarte, F M. Pinto-Vilela, and M. Da-Penha. 2018.

Enhancement of antioxidant properties from green coffee as promising ingredient for food and cosmetic industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16:43-48.

Suárez-Quiroz, M.L., W. Taillefer, E.M. López-Méndez, O. González-Ríos, P. Villeneuve, and M.C. Figueroa-Espinoza. 2013a. Antibacterial activity and antifungal and anti-mycotoxigenic activities against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus* of green coffee chlorogenic acids and dodecyl chlorogenates. *Journal of Food Safety*, 33:360-368.

Suárez-Quiroz, M., Campos, A., Alfaro, V., González-Ríos, O., Villeneuve, P., Figueroa-Espinoza, M. 2013b. Anti-*Aspergillus* activity of green coffee 5-O-caffeoyl quinic acid and its alkyl esters. *Microbial Pathogenesis*, 61-62: 51-56.

Thomas, P., Sekhar, A., Upreti, R., Mujawar, M., Pasha, S. 2015. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnology Reports*, 8, 45–55.

Tomás-Barberán, F. & Espín, J. C. 2019. Effect of Food Structure and Processing on (Poly)phenol–Gut Microbiota Interactions and the Effects on Human Health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10:221-38.

Umaña, G., 2014. Guía para el establecimiento de módulos para microbeneficiado de café. San José, C.R.: MAG/ Agencia de Servicios Agropecuarios de León Cortés/ SUNII/FITTACORI.

Vignola, R., Watler, W., Poveda, K., Vargas, A. 2018. Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en el cultivo del café en Costa Rica. Ficha Técnica Cultivo de Café. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/reduccion-impacto-por-eventos-climaticos/Informe-final-cafe.pdf>

Wang, M., Zhang, W., Zheng, X., Zhu, P. 2017. Antibacterial and catalytic activities of biosynthesized silver nanoparticles prepared by using an aqueous extract of green coffee bean as a reducing agent. *Royal Society of Chemistry Advances*, 7, 12144.

Yeretzian, C., Gloss, A., Petrozzi, S., D'Ambrosio, L., Knopfl-Lengweller, K., Wieland, F., Fridoli, A., Aniker, R. 2010. The smell of coffee-an analytical perspective. *New Food Magazine*, 4, 10-17.

Zeb, Alam. 2020. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44: e13394.

Anexo 1. Resultados estadísticos

```
drop1(mod.trat1, test="LRT")
## Single term deletions
##
## Model:
## crecimiento ~ concent + Positivo + bloque
##      Df Deviance   AIC    LRT Pr(>Chi)
## <none>      105.63 119.63
## concent    3   164.45 172.45 58.823 1.049e-12 ***
## Positivo   1   130.61 142.61 24.980 5.794e-07 ***
## bloque     2   137.28 147.28 31.648 1.342e-07 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

