



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

TITULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**Actividad antimicrobiana de extractos de subproductos de café**

*Coffea arábica* y cacao *Theobroma cacao L.*

TRABAJO DE TITULACIÓN

**AUTORA:** Albán Motoche, Karla Gabriela

**DIRECTOR:** Cartuche Flores, Luis Emilio, M. Sc

LOJA – ECUADOR

2017



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2017

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

Luis Emilio Cartuche Flores.

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: Actividad antimicrobiana de extractos de subproductos de café *Coffea arábica* y cacao *Theobroma cacao L.* realizado por Karla Gabriela Albán Motoche, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2017

f).....

## DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Albán Motoche Karla Gabriela declaro ser la autora del presente trabajo de titulación: **Actividad antimicrobiana de extractos de subproductos de café *Coffea arábica* y cacao *Theobroma cacao L.*** de la Titulación de Ingeniería en Alimentos, siendo M.Sc. Luis Emilio Cartuche Flores director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de Investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.....

Autor: Albán Motoche Karla Gabriela

Cédula: 1105883662

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la fortaleza y guiar mis pasos.

Este trabajo va dedicado especialmente a mis padres, Irma y Naún por todo el cariño y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de estos años, por ser los pilares fundamentales para llevar a cabo esta meta, especialmente a mi madre por ser mi más grande inspiración para luchar cada día.

A mis hermanos y por siempre apoyarme, escucharme.

A mi familia por el apoyo y los consejos brindados.

A mis amigas y amigos por siempre estar en momentos buenos y malos.

## AGRADECIMIENTO

A **Dios** por bendecirme, guiarme a lo largo de mi carrera permitiéndome cumplir con este anhelado sueño.

A la **UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA** por permitirme realizar mis estudios y cumplir con mi meta propuesta.

A mi **Director de tesis** M. Sc Luis Emilio Cartuche Flores, por todos los conocimientos impartidos, paciencia, guiarme, y por siempre estar predispuesto a ayudarme, para poder finalizar este trabajo de la mejor manera.

Al igual me gustaría agradecer a la M. Sc. Maritza Castillo por brindarme su apoyo, tiempo, dedicación y sugerencias en este trabajo.

Agradecer a cada uno de los docentes por todos los conocimientos impartidos a lo largo de mi carrera, de manera especial al Ing. Holger Jaramillo por toda la ayuda brindada y siempre darme una palabra de aliento ante las situaciones más difíciles.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b> .....	ii
<b>DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	v
<b>INDICE DE CONTENIDOS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>1. REVISIÓN LITERARIA</b> .....	5
1.1. Cacao.....	6
1.2. Café .....	7
1.3. Metabolitos secundarios .....	8
1.3.1. Compuestos fenólicos.....	8
1.4. Conservantes alimentarios .....	9
1.5. Actividad antimicrobiana.....	10
1.5.1. Generalidades. ....	10
1.5.2. Métodos de evaluación antimicrobiana. ....	10
1.5.2.1. Método de difusión en agar. ....	10
1.5.2.2. Método de microdilución en caldo. ....	11
1.6. Principales microorganismos que afectan en la industria alimentaria. ....	11
1.7. Descripción y características de bacterias utilizadas. ....	12
1.7.1. Escherichia coli. ....	12
1.7.2. Enterococcus faecalis. ....	12
1.7.3. Micrococcus luteus. ....	13
1.7.4. Staphylococcus aureus.....	13
1.7.5. Candida albicans. ....	14
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
2.1. Muestra y preparación.....	16
2.1.1. Cacao. ....	16
2.1.2. Subproducto de café.....	16

2.2. Obtención de extractos.....	17
2.3. Pruebas antimicrobianas .....	18
2.3.1. Microorganismos de prueba.....	18
2.3.2. Preparación del extracto. ....	18
2.3.3. Método de difusión en agar.....	18
2.3.3.1. Preparación del inóculo. ....	18
2.3.3.2. Siembra de las placas. ....	18
2.3.3.3. Interpretación de resultados. ....	19
2.3.4. Método de microdilución en caldo.....	20
2.3.4.1. Preparación de la microplaca. ....	20
2.3.4.2. Siembra de la microplaca. ....	20
2.3.4.3. Interpretación de resultados. ....	21
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
3.1. Rendimiento de extractos.....	23
3.2. Actividad antimicrobiana.....	24
3.2.1. Difusión en agar.....	24
3.2.2. Microdilución en caldo.....	29
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>32</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>42</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Partes del fruto de cacao .....	6
<b>Figura 2.</b> Subproducto de café .....	7
<b>Figura 3.</b> Obtención del subproducto en polvo. <b>a.</b> Cerezo de café; <b>b.</b> Pulpa deshidratada; <b>c.</b> Café en polvo.....	16
<b>Figura 4.</b> Esquema del procedimiento de difusión en agar .....	19
<b>Figura 5.</b> Ilustración de la microplaca TC <sub>90</sub> hechas con 12 columnas y 8 filas (A - H).....	21
<b>Figura 6.</b> Halos de inhibición de extracto de polvo de cacao, <b>a.</b> ETOH a 20°C, <b>b.</b> ETOH: H <sub>2</sub> O a 20°C, <b>c.</b> ETOH: H <sub>2</sub> O a 40°C, <b>d.</b> ETOH: H <sub>2</sub> O a 60°C.....	27

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de <i>Escherichia coli</i> _____	12
<b>Tabla 2.</b> Taxonomía de <i>Enterococcus faecalis</i> _____	12
<b>Tabla 3.</b> Taxonomía de <i>Micrococcus luteus</i> _____	13
<b>Tabla 4.</b> Taxonomía <i>Staphylococcus aureus</i> _____	13
<b>Tabla 5.</b> Taxonomía de <i>Candida albicans</i> _____	14
<b>Tabla 6.</b> Tratamientos para la obtención de extractos _____	17
<b>Tabla 7.</b> Condiciones para la reactivación de cepas _____	18
<b>Tabla 8.</b> Rendimientos de cacao en polvo y subproducto de café (pulpa). _____	23
<b>Tabla 9.</b> Tamaño del halo de la inhibición (mm) de extracto de subproducto de café y polvo de cacao, frente a cepas bacterianas de estudio mediante el método de difusión en agar. 25	
<b>Tabla 10.</b> Halos de controles positivos mediante la técnica de difusión en agar. _____	28
<b>Tabla 11.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de subproducto de café y cacao en polvo frente a las cepas ensayadas mediante el método de microdilución en caldo. _____	29
<b>Tabla 12.</b> Controles positivos obtenidos mediante microdilución en caldo. _____	31

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> <i>Valores iniciales para la obtención de extractos de subproducto de café y polvo de cacao.....</i>	43
<b>Anexo B.</b> <i>Datos obtenidos del tamaño de halo de inhibición de extractos de subproducto de café y polvo de cacao mediante la técnica de difusión en agar.....</i>	44
<b>Anexo C.</b> <i>Controles positivos realizados en la técnica de difusión .....</i>	45
<b>Anexo D.</b> <i>Concentración mínima inhibitoria de extractos de café y cacao.....</i>	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>MTT</b>	3 - (4,5 - Di metil tiazol -2-il) -2,5-bromuro difeniltetrazolio
<b>µg</b>	microgramos
<b>mg</b>	miligramos
<b>U</b>	unidades
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>ETA´s</b>	Enfermedades de transmisión alimentaria
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>µL</b>	micro litros
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>mm</b>	milímetros
<b>mL</b>	mililitros
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>mg/mL</b>	miligramos/mililitros
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>E. faecalis</i></b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>M. luteus</i></b>	<i>Micrococcus luteus</i>
<b><i>C. albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i>

## RESUMEN

Debido a que hoy en día se buscan alimentos naturales que proporcionen beneficios para salud, la presente investigación tuvo como finalidad dar a conocer el potencial antimicrobiano de pulpa de café procedente de la parroquia Vilcabamba y cacao en polvo proporcionado por la empresa TULICORP. Se obtuvieron extractos mediante maceración con EtOH absoluto, EtOH: H<sub>2</sub>O (50/50) y H<sub>2</sub>O a diferentes temperaturas (20°C, 40°C y 60°C) y se evaluó su actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Candida albicans* mediante técnicas de sensibilidad *in vitro* como difusión en agar y microdilución en caldo. Como controles positivos para el primer método se usó: discos de gentamicina, amikacina, voriconazol y nistatina y para el segundo método se empleó gentamicina, terbinafina e Itraconazol. Los extractos de cacao EtOH a 20°C y mezcla EtOH: H<sub>2</sub>O a 20°C, 40°C y 60°C presentaron halos de inhibición entre 6 y 7 mm frente a *Micrococcus luteus* indicando resistencia a una dosis de 80 mg/mL y mediante el método de microdilución en caldo, presentó un CMI de 4000 µg/mL considerando los extractos inhibidores débiles.

**Palabras claves:** Potencial antimicrobiano, difusión en agar, microdilución en caldo, café, cacao.

## ABSTRACT

Since nowadays natural health food sources are well wanted due to their health benefits, the present study had as ultimate objective the knowledge spreading about the antimicrobial potential of the Vilcabambe an coffee pulp and cocoa powder as well, this provided by the TULICORP corporation. Extracts were obtained by absolute ethanol (EtOH), EtOH:H<sub>2</sub>O (50/50) and pure H<sub>2</sub>O maceration at different temperatures (20°C, 40°C and 60°C) and the extracts activity was evaluated against *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *M. luteus* and *C. albicans* by *in vitro* sensibility techniques such as agar diffusion and broth microdilution. As positive controls for the first method were used: gentamicin discs, amikacin, voriconazole and nystatin and for the second method was used, gentamicin, terbinafine and itraconazole. The cacao extracts from EtOH at 20°C and EtOH: H<sub>2</sub>O mixture at 20°C, 40°C and 60°C, all with inhibition halos wich vary between 6 and 7 mm against *M. luteus* indicating resistance with a 80 mg/mL dose by the broth microdilution method, presented a MIC value of 4000 µg/mL, considering the extracts as weak inhibitors.

**Keywords:** Antimicrobial potential, diffusion agar, broth microdilution, cocoa, coffee pulp.

## INTRODUCCIÓN

Los conservantes son utilizados para prolongar y mantener la vida útil de los alimentos , mediante la inhibición de microorganismos como bacterias y hongos, que son los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos(ETA,s). En la actualidad la industria alimentaria busca el desarrollo de nuevas tecnologías para la obtención de productos inocuos, debido a que la exigencia de los consumidores es cada vez mayor en cuanto a productos menos procesados que mantengan sus características organolépticas y nutricionales (González, Martínez, Rossi, Tornese, & Troncoso, 2010).

Es por ello que se busca sustituir los conservantes químicos (benzoatos, nitritos, nitratos y anhídrido sulfuroso) por extractos naturales de plantas, especias, frutas y hierbas; los cuales han resultado adecuados gracias a la presencia de moléculas bioactivas como ácidos orgánicos, compuestos alifáticos, alcaloides, adegidos, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, fitoalexinas, terpenos y compuestos fenólicos (Rodríguez, 2011; Gyawali & Ibrahim, 2014; Guil-Guerrero et al., 2016; Vodnar et al., 2017). La pulpa de café contiene cafeína, ácidos fenólicos (caféico y clorogénico), polifenoles y alcaloides, el grano de cacao posee polifenoles, taninos, azúcares, polisacáridos y alcaloides (Crescente, Acosta, Guevara, & Estaba, 1998; Lazcano-Sánchez, Trejo-Márquez, Vargas-Martínez, & Pascual-Bustamante, 2015).

El método de difusión en agar es uno de los métodos que recomienda la National Committee for Clinical Laboratories Standards (CLSI) para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos, al igual que el método de microdilución en caldo se emplea para determinar la concentración mínima en la que un antimicrobiano inhibe el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones óptimas de crecimiento

Pruthviraj, Suchita, Shital, & Shilpa ( 2011) evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de Café (*Coffea arábica*) contra los microorganismos gramnegativos: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*; se evidenció la capacidad antimicrobiana de los extractos mediante el método de microdilución con valores de CMI entre 650,5 a 2500 µg / mL.

En el cacao (*Theobroma cacao* L.) se realizó estudios sobre la capacidad antimicrobiana que posee, reportándose estudios contra *Escherichia coli*, con CMI de 835 mg/mL, produciendo una fragmentación de células y de esta manera un daño permanente; mediante lo cual se puede concluir que el extracto de cacao es una buena alternativa como agente antimicrobiano (Ariza et al., 2014).

Se realizó esta investigación con el fin de promover el aprovechamiento de subproductos de la industria alimentaria para la elaboración de alimentos saludables y con potencial funcional evaluando la capacidad antimicrobiana de extractos obtenidos de la pulpa del café (*Coffea arábica*) y del grano del cacao (*Theobroma cacao L.*) y utilizando como solventes EtOH, mezcla 50/50 EtOH: H<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O a temperaturas de extracción diferentes (20 °C, 40°C, 60°C) mediante maceración dinámica ; para ello se utilizó pruebas de sensibilidad *in vitro* tales como difusión en agar y microdilución en caldo.

En el capítulo 1 de este trabajo se muestra una revisión literaria de las generalidades de cacao y café respectivamente, subproductos, revisión breve de las cepas que se utilizaron y fundamentos de los métodos. En el capítulo 2 se describe materiales y métodos para la obtención de los extractos y para la realización de pruebas antimicrobianas; finalmente el capítulo 3 de resultados y discusión donde se analiza y compara los resultados con bibliografía.



## **1. REVISIÓN LITERARIA**

## 1.1. Cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) pertenece a la familia Sterculiaceae (Figura 1), es nativo de los bosques húmedos de América del Sur, entre las variedades están: Criollos, Forasteros y Trinitario (mezcla de las dos variedades). Por lo general las semillas (grano) se las utiliza en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y otros derivados (Arévalo et al., 2007).



**Figura 1.** Partes del fruto de cacao

**Fuente:** Beckett (2008)

**Elaboración:** Beckett (2008)

Ecuador es el primer productor de cacao fino y de aroma a nivel mundial (Instituto de promoción de Exportaciones e Inversiones PRO ECUADOR, 2013). De la producción total el 60% del grano es exportado, de este porcentaje el 40% se lo transforma en derivados como: polvo, licor, manteca, tortas, chocolates (Medina, Ortiz, & Coronel, n.d.).

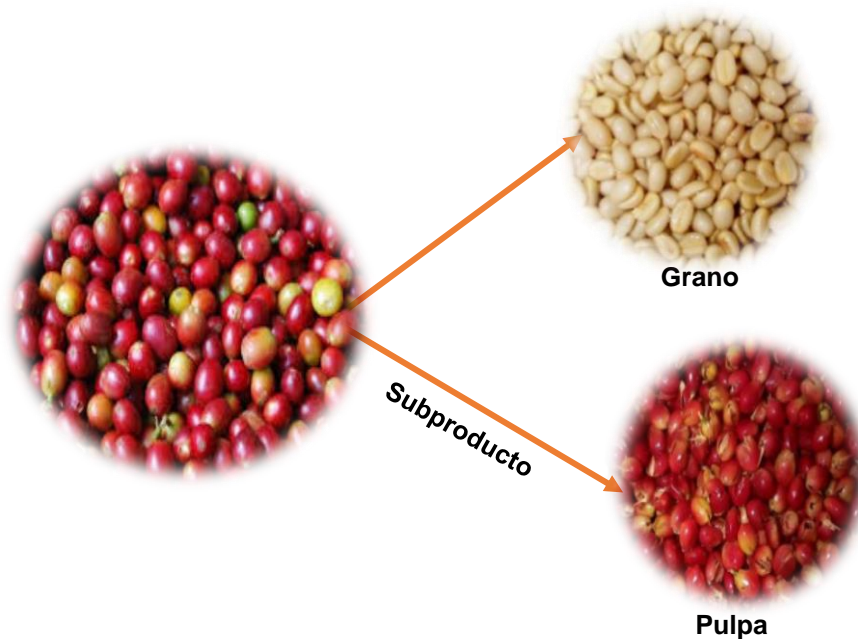
El grano de cacao contiene del 10 al 22 % de grasa, aminos y alcaloides como teobromina, cafeína, tiramina, dopamina, salsolinol, trigonelina, ácido nicotínico, aminoácidos libres; taninos, fosfolípidos; vitaminas; proteínas; pectinas; lisina; lecitina, etc. (Waizel-haiat, Waizel-bucay, Magaña-serrano, Campos-bedoya, & San Esteban-sosa, 2012), entre los metabolitos secundarios que posee el cacao se encuentran los compuestos fenólicos, flavonoides, catequinas o flavan - 3 oles (37%), proantocianinas (58%), antocianinas (4%) (Martínez Flores, Gallego Gonzales, Culebras, & Tuñón, 2002), siendo los fenoles los compuestos más importantes que posee el cacao debido a que se los asocia con propiedades antioxidantes, antitumorales, antimicrobiana e insecticidas (Quiñones-Gálvez, Hernández, Quirós, Capdesuñer, & Sánchez, 2016).

La epicatequina es la principal catequina debido a que constituye el 30% del contenido de polifenoles del grano de cacao (Sotelo, Alvis, & Arrázola, 2015), es de gran interés debido a que es un compuesto bioactivo ya que protege al organismo de la polución ambiental y

sustancias químicas presentes en los alimentos (Lecumberri et al., 2006), además ayuda a la dilatación arterial por lo que posee un gran efecto sobre la salud cardiovascular (Sotelo et al., 2015), otros compuestos en menor proporción son quercetina, hiperosida, isoquercitrina, naringenina, luteolina y apigenina (Cuéllar, 2010; Maydata, 2002; Sánchez & Rubio, 2010).

## 1.2. Café

El café (*Coffea arabica*) pertenece a la familia Rubiaceae (Figura 2) originario de Etiopia, presenta más de 500 géneros (Corporación Ecuatoriana de Cafetaleras y Cafetaleros CORECAF)" y 25 variedades, entre las más conocidas y utilizadas están la *arabica* y *canephora (robusta)* (Días, 2011), además existen 2000 especies de árboles tropicales y arbustos alrededor del mundo.



**Figura 2.** Subproducto de café  
**Fuente:** La experimentación  
**Elaboración:** La autora

El Ecuador es uno de los principales países productores de cafés especiales y con mayor demanda en Europa (Días, 2011), la producción es de 63% de la variedad *arábica*, considerada de mejor calidad y 37% del *robusta* (Monteros, 2016).

Los granos de café contienen antioxidantes como cafeína, ácidos fenólicos (caféico y clorogénico), polifenoles y alcaloides; estos componentes tienen propiedades funcionales y nutraceuticas (Borges, Ortega, Roncal, & Esther, 2008). La cafeína, trigonelina, ácidos fenólicos, ácido clorogénico, aminoácidos, minerales e hidratos de carbono se encuentran dentro de los compuestos no volátiles más importantes y entre los volátiles están los ácidos, aldehídos, cetonas, ésteres, aminas y compuestos azufrados (Borges et al., 2008).

Entre los metabolitos secundarios presentes en el café encontramos la cafeína, teofilina, teobromina, paraxantina, escopolina; ácido caféico, cumárico, clorogénico, vinílico (compuestos fenólicos) (Stalmach et al., 2009).

En la industria cafetera solo se utiliza el 9,5 % del grano para la elaboración de la bebida, el 90,5% restantes corresponde a los subproductos que son subutilizados y que corresponden a 41% de pulpa, 16% de mucílago y 4,5% de la cascarilla (Rodríguez, 2002). Estos subproductos al no ser utilizados generan una gran contaminación, aunque en la actualidad la pulpa de café es utilizada para la producción de biogás, obtención de abono orgánico, alcohol, vinos, alimentación animal, carbón activado y producción de hongos comestibles (Coronel & Marín, 2010). Al igual que el grano, los subproductos son de interés por la presencia de compuestos como taninos, cafeína y ácidos clorogénicos.

### **1.3. Metabolitos secundarios**

Las plantas y otras fuentes naturales pueden proporcionar una gran variedad de compuestos complejos y diversos; recientemente varios investigadores se han centrado en la búsqueda de plantas y extractos que posean un efecto antimicrobiano, siendo los componentes de mayor estudio aceites esenciales, metabolitos secundarios y moléculas sintetizadas como agentes antimicrobianos potenciales (Balouiri, Sadiki, & Koraichi, 2016). Los antimicrobianos naturales pueden obtenerse de diferentes fuentes, incluyendo plantas, animales, bacterias, algas y hongos (Gyawali & Ibrahim, 2014).

Los compuestos derivados de las plantas, hierbas y de las especias se han utilizado desde los tiempos antiguos para condimentar los alimentos, como medicina tradicional, y conservantes, así como para impartir sabor y color. Entre los compuestos principales que son responsables de la actividad antimicrobiana de las plantas, destacan los metabolitos secundarios, moléculas orgánicas producidas como sustancias de defensa y que no están implicadas en el crecimiento y desarrollo de un organismo; se encuentran en menor cantidad que los metabolitos primarios (Agostini-costa, Vieira, Bizzo, Silveira, & Gimenes, n.d.) y se incluyen a los fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, terpenoides y alcaloides; que gracias a sus variaciones en la estructura y composición química dan lugar a su acción antimicrobiana (Gyawali & Ibrahim, 2014).

#### **1.3.1. Compuestos fenólicos.**

Los compuestos fenólicos poseen grandes variaciones estructurales y son uno de los más diversos grupos de metabolitos secundarios, se encuentran mayormente en plantas. Los principales componentes que forman parte de este grupo son ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, ácidos caféico, clorogénico, *p*-coumárico, ferúlico (Gyawali & Ibrahim, 2014; Rodríguez, 2011); estos compuestos retardan la putrefacción de frutas y vegetales, el crecimiento microbiano, poseen actividad inhibitoria frente a bacterias grampositivas,

gramnegativas, hongos y levaduras, en los seres humanos favorecen a la secreción de bilis, reducen los niveles de colesterol y lípidos en sangre (Gyawali & Ibrahim, 2014); se los considera anticancerígenos y antiinflamatorios (Orihuela, 2016).

Los flavonoides se encuentran principalmente en vegetales, frutas y bebidas; ayudan a la protección del organismo del daño causado por sustancias químicas presentes en los alimentos, agentes oxidantes como rayos ultravioleta (Martínez Flores et al., 2002) la contaminación ambiental, además se han identificado efectos antibacterianos, antialérgicos, antiinflamatorios, anti carcinogénicos (Orihuela, 2016).

Las antocianinas forman parte de los pigmentos de las flores, frutos y a veces en hojas, tallos y raíces, se caracterizan por sus colores brillantes y solubilidad en agua, son de gran importancia para la industria alimentaria como aditivo por considerarse inocuo, además poseen beneficios para la salud ya que reducen los niveles de colesterol, proporcionan defensa contra enfermedades cardíacas y previene el cáncer; lo que se asocia a su poder antioxidante (Condezo, 2011).

#### **1.4. Conservantes alimentarios**

El uso de conservantes es una de las maneras más frecuentes que utiliza la industria alimentaria para mantener y alargar la vida útil del producto, la mayoría de los conservantes utilizados son sintetizados químicamente por lo que se los asocia como causantes de enfermedades, intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades degenerativas (Rodríguez, 2011); siendo los de mayor uso los benzoatos, nitritos, nitratos y anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>).

La principal función de un conservante es controlar el crecimiento de bacterias y hongos, es por eso que se los adiciona de manera intencional (Rodríguez, 2011) para controlar procesos de deterioro en los alimentos durante el almacenamiento y comercialización; así como el crecimiento de microorganismos patógenos y no patógenos (Rea, 2011).

Entre las acciones más importantes que tienen los conservantes sobre los microorganismos, son inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular, daño a la integridad de las membranas, interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales, enzimas metabólicas, síntesis de proteína y el sistema génico (Rodríguez, 2011)

Debido a que los conservantes químicos no tienen buena aceptación por parte del consumidor, en la actualidad se busca nuevas alternativas que permitan sustituirlos por antimicrobianos naturales (Rodríguez, 2011), es por ello que se ha estudiado extractos de plantas, especies, frutas y hierbas, en donde la presencia de ciertos metabolitos puede actuar como inhibidores antimicrobianos. Los ácidos orgánicos, alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, fitoalexinas y compuestos fenólicos (Domingo & López, 2013; Rodríguez, 2011), han demostrado actividad inhibitoria frente a bacterias grampositivas, gramnegativas, hongos y levaduras (Gyawali & Ibrahim, 2014).

## 1.5. Actividad antimicrobiana

### 1.5.1. Generalidades.

Tapia (2012) afirma que la actividad antimicrobiana es “La capacidad que posee un fármaco o compuesto natural de inhibir el crecimiento de microorganismos”. Los compuestos que poseen una actividad antimicrobiana son de gran importancia a nivel mundial ya que mediante ellos se puede controlar enfermedades transmitidas por alimentos.

Los antimicrobianos al igual que los antibióticos son esenciales para tratar infecciones causadas por bacterias, sin embargo su utilización excesiva o equívoca en la medicina humana, hacen que los tratamientos de enfermedades infecciosas en el hombre dejen de ser eficaces debido a la aparición y proliferación de bacterias resistentes. En la cadena alimentaria las bacterias resistentes se introducen a través de los animales como la *Salmonella* a través del pollo (OMS, 2015).

Se cree que los grupos hidroxilo (OH) en compuestos fenólicos causan una acción inhibidora ya que estos pueden interactuar con la membrana celular de bacterias para romper estructuras de membrana y causar la fuga de componentes celulares (Gyawali & Ibrahim, 2014).

### 1.5.2. Métodos de evaluación antimicrobiana.

#### 1.5.2.1. Método de difusión en agar.

Se conoce con el nombre de difusión en discos o Kirby-Bauer, es una técnica cuantitativa de difusión en agar, recomendada por organismos internacionales como la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés), Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) y Centros para Control y prevención de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) (Cuéllar, 2010). Esta prueba es aplicada específicamente a bacterias de crecimiento rápido. Los resultados se pueden interpretar como sensibles, intermedio y resistentes en función del diámetro del halo alrededor del pocillo. El diámetro del halo depende del grosor del medio, la concentración del disco y del inóculo (Herrera, 1999); por lo que es necesario controlar estas variables y evitar así cualquier interferencia. El porcentaje de inhibición se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación (Cuéllar, 2010).

$$\% \text{Inhibición} = \frac{(\text{Diámetro halo muestra}) *}{(\text{Diámetro halo control})} 100$$

#### **1.5.2.2. Método de microdilución en caldo.**

Este método se emplea para determinar la concentración mínima en la que un antimicrobiano inhibe el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones óptimas de crecimiento. Los resultados se observan a las 24 h de incubación y se considera un método sencillo, rápido, fácil de ajustar y permite leer una gran cantidad de muestras. Una de sus principales ventajas es que permite utilizar antimicrobianos que son solubles e insolubles en agua y aceites (Abad, 2009; Andrews, 2001; Rodríguez-Tudela et al., 2003).

Además la CMI se considera como el "Estándar de oro " ya que permite obtener resultados precisos y confirmar resistencias que con otros métodos no están muy claras (Gutiérrez & Droguet, 2002).

#### **1.6. Principales microorganismos que afectan en la industria alimentaria.**

La causa más importante de la disminución de la calidad de los alimentos y seguridad biológica es el desarrollo de microorganismos como bacterias, hongos, virus y parásitos que penetran el organismo mediante el consumo de alimentos o agua contaminada (González et al., 2010) y que son causantes de más de 200 enfermedades.

Los patógenos de transmisión alimentaria pueden producir diarrea grave o infecciones debilitantes, como la meningitis; así como también intoxicaciones agudas o enfermedades de larga duración, como el cáncer. Las frutas y hortalizas contaminadas con heces, alimentos de origen animal crudos y mariscos crudos que contienen toxinas marinas son considerados como los alimentos más insalubres. *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Salmonella* *Campylobacter* son los principales patógenos de transmisión de enfermedades de origen alimentario con consecuencias graves o mortales que afectan a millones de personas (OMS, 2015).

Estos patógenos causan pérdida de la vida útil y calidad del producto, además de las características sensoriales (Bibek et al., 2010), dando como resultado pérdidas cuantiosas para la industria alimentaria y por ende, inseguridad en el consumidor a la hora de adquirir el producto.

## 1.7. Descripción y características de bacterias utilizadas.

### 1.7.1. *Escherichia coli*.

**Tabla 1.** Taxonomía de *Escherichia coli*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>coli</i>

**Fuente:** Tapia ( 2012)

**Elaboración:** La autora

Son bacilos gramnegativos, que no forman esporas, pueden presentarse solos, en pares, agrupados o en cadenas, su diámetro es de 1 a 3  $\mu\text{m}$  por 0,5 $\mu\text{m}$ , además presentan varias formas desde cocos a pequeños bastoncillos por lo general son móviles por flagelos peritricos, aunque existen variantes móviles no flageladas (Granados,2003).

Pueden ser aeróbicas o anaeróbicas facultativas dependiendo de sus requerimientos, sobreviven hasta 42°C, los medios utilizados para su crecimiento son agar sangre, agar nutriente, agar sangre chocolate o caldo nutritivo (Llop et al., 2001).

En cultivos jóvenes presenta forma cocobacilar y en cultivos viejos presentan formas de una dimensión mayor; produce dos tipos de fibra que rigen su capacidad y regulan la flora normal debido a una enzima denominada bacteriocina según el principio de la antibiosis (Koneman, 2008).

### 1.7.2. *Enterococcus faecalis*.

**Tabla 2.** Taxonomía de *Enterococcus faecalis*

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	Enterococcaceae
Género	<i>Enterococcus</i>
Especie	<i>faecalis</i>

**Fuente:** Günter ( 2003)

**Elaboración:** La autora



Son cocos grampositivos que se muestran de distintas formas ya sea en pares o cadenas cortas, no forman endosporas, su tamaño es de 0,6 - 2,0 x 0,6 - 2,5 µm, se pueden observar como células ovoides o esféricas, su temperatura óptima de crecimiento es 37°C pero se desarrollan a temperaturas desde los 10°C hasta los 45°C. Se caracterizan por ser anaerobios facultativos y catalasa negativos, fermentan la glucosa a ácido láctico, además de sobrevivir a condiciones muy adversas (60°C – 30 min) (Rosas, 2014).

### 1.7.3. *Micrococcus luteus*.

**Tabla 3.** Taxonomía de *Micrococcus luteus*

Reino	Bacteria
Filo	Actinobacteria
Clase	Actinobacteria
Orden	Actinomycetales
Familia	Micrococcaceae
Género	<i>Micrococcus</i>
Especie	<i>luteus</i>

**Fuente:** Koneman & Allen (2008)

**Elaboración:** La autora

Son bacterias grampositivas se las puede encontrar en forma de racimos o tétradas, sus colonias son de color amarillo lo cual se debe a la producción de compuestos carotenoides, su tamaño oscila entre 0,5 y 3 µm, son aerobios y catalasa positiva (Rubio, 2013).

### 1.7.4. *Staphylococcus aureus*.

**Tabla 4.** Taxonomía de *Staphylococcus aureus*

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>aureus</i>

**Fuente:** Koneman & Allen (2008)

**Elaboración:** La autora

Es un coco que crece agrupado en racimos, presenta un diámetro de 0,8 a 1µm, forma colonias de color amarillo, es inmóvil, aerobio y anaerobio facultativo, por lo general son grampositivos pero las células viejas y microorganismos que son fagocitados se los considera

gramnegativos, es catalasa y coagulasa positivo, produce fermentación láctica y puede crecer en agua de mar (Mensa et al., 2004). Tiene un mayor crecimiento en agar sangre, infusión cerebro- corazón, chocolate, los cuales son medios de cultivo no selectivo (Tapia, 2012).

### 1.7.5. *Candida albicans*.

**Tabla 5.** Taxonomía de *Candida albicans*

Reino	Fungi
Filo	Deuteromiceta
Clase	Saccharomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>albicans</i>

**Fuente:** Pardi & Cardozo (2002)

**Elaboración:** La autora

Son consideradas levaduras, pueden mostrarse solas o en racimos, son aerobias, de color blanco pero al momento de envejecer pueden tomar un color crema o bronce (Pardi & Cardozo, 2002), se desarrollan a temperatura ambiente o a 37°C. El medio propicio para su crecimiento es el agar Sabouraud, en el cual se observa colonias con las siguientes características: irregulares, cremosas, húmedas, opacas, que al envejecer desarrollan hifas al interior del agar (Tapia, 2012).

“Es un hongo dimorfo capaz de producir hifas y micelios verdaderos, a menudo forma pseudomicelios compuestos de pseudohifas. Las paredes celulares de *C. albicans* contienen los constituyentes micóticos típicos y además compuestos no identificados que son tóxicos” (Bonilla, 2011).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Muestra y preparación

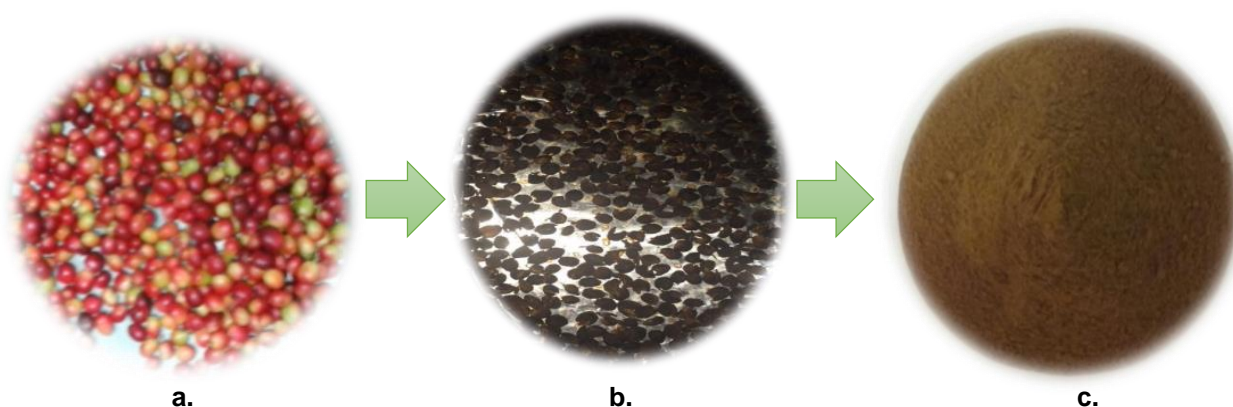
En el presente estudio se trabajó con pulpa de café (*Coffea arabica*) proveniente de la parroquia Vilcabamba en la provincia de Loja, asimismo se trabajó con cacao en polvo (*Theobroma cacao L.*) desengrasado, proporcionado por la empresa TULICORP S.A.

### 2.1.1. Cacao.

El cacao en polvo presentó un proceso de desengrasado previo, efectuado por el proveedor, con un remanente de grasa de 10 a 12 g/100 g, con un tamaño de partícula  $\leq 350 \mu\text{m}$ , el mismo que se lo almacenó en fundas ziploc con cierre hermético a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

### 2.1.2. Subproducto de café.

El cerezo de café, se seleccionó, lavó y desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante 5 minutos. La separación de la pulpa se realizó manualmente y se deshidrató en una estufa de convección forzada a 60 °C (marca COLE PARNER, MODELO 5200 – 70, Chicago, USA) por 48 horas. La muestra seca se trituroó en un molino mecánico manual y posteriormente en un molino ultracentrífugo de discos (marca Retsch ZM 200) hasta obtener un tamaño de partícula  $\leq 350 \mu\text{m}$  (Figura 3). Posteriormente el subproducto se almacenó en fundas ziploc con sello hermético a temperatura ambiente



**Figura 3.** Obtención del subproducto en polvo. **a.** Cerezo de café; **b.** Pulpa deshidratada; **c.** Café en polvo.

**Fuente:** La experimentación

**Elaboración:** La autora

## 2.2. Obtención de extractos

Para este proceso se utilizó como disolventes, etanol, agua y mezcla etanol: agua en proporción 1:1 a diferentes temperaturas tal y como se observa en la **Tabla 6**. El etanol utilizado fue de grado absoluto (ACS Basic, Scharlau 99,5%). Los extractos se obtuvieron de acuerdo al diseño experimental estadístico factorial, utilizando el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI.

**Tabla 6.** Tratamientos para la obtención de extractos

<b>Solvente</b>	<b>Temperatura(°C)</b>
Etanol	20
Agua	20
Etanol: agua (50:50 v/v)	60
Etanol	40
Agua	60
Etanol: agua (50:50 v/v)	40
Etanol	60
Etanol: agua (50:50 v/v)	20
Agua	40

**Elaboración:** La autora

Cada extracto se preparó usando una relación muestra: disolvente, 1:20 (1 g de muestra + 20 ml de disolvente), macerando a agitación constante a 2500 rpm durante 90 minutos. Para la obtención del sobrenadante se centrifugó el extracto por 30 minutos a 2800 rpm (Centrífuga, marca CLAY ADAMS® Brand DYNAC®, Becton Dickinson and Company, MD, USA).

El sobrenadante obtenido se rotaevaporó a 37°C a vacío para la eliminación del etanol; el extracto obtenido se lo deshidrató en un liofilizador (marca LABCONCO), se colocó en viales esterilizados y se almacenaron en congelación hasta su posterior uso.

Se calculó el rendimiento de extracción expresándolo como porcentaje respecto a la muestra deshidratada, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento extracción(\%)} = \frac{\text{peso del extracto}(g)}{\text{peso de la muestra}(g)} * 100$$

## 2.3. Pruebas antimicrobianas

### 2.3.1. Microorganismos de prueba.

Los microorganismos utilizados fueron: *Staphylococcus aureus subsp., aureus* ATCC® 25923™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 19433™, *Escherichia coli* ATCC® 43888™, *Micrococcus luteus* ATCC® 10240™, *Candida albicans* ATCC® 10231™; las cepas se cultivaron a partir de la reserva criogénica mantenida a -80 °C.

Para la preparación del cultivo overnight, se tomó una alícuota de 300 µl y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 7 mL de los caldos descritos en la **Tabla 7**, de acuerdo a las especificaciones de cada microorganismo.

**Tabla 7.** Condiciones para la reactivación de cepas

Microorganismos	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
<i>E. coli</i>	Caldo Tryptisoya	35 °C por 14 – 16 h
<i>S. aureus</i>		
<i>E. faecalis</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	
<i>M. luteus</i>	Caldo Infusión Cerebro Corazón	
<i>C. albicans</i>	Caldo Sabouraud	

**Fuente:** la experimentación

**Elaboración:** La autora

### 2.3.2. Preparación del extracto.

Se trabajó con una dilución de 80 mg/mL, utilizando como diluyente Dimetil sulfóxido (DMSO) para extracto de cacao y mezcla Dimetil sulfóxido: agua destilada en proporción 1:1 en extracto de café.

### 2.3.3. Método de difusión en agar.

#### 2.3.3.1. Preparación del inóculo.

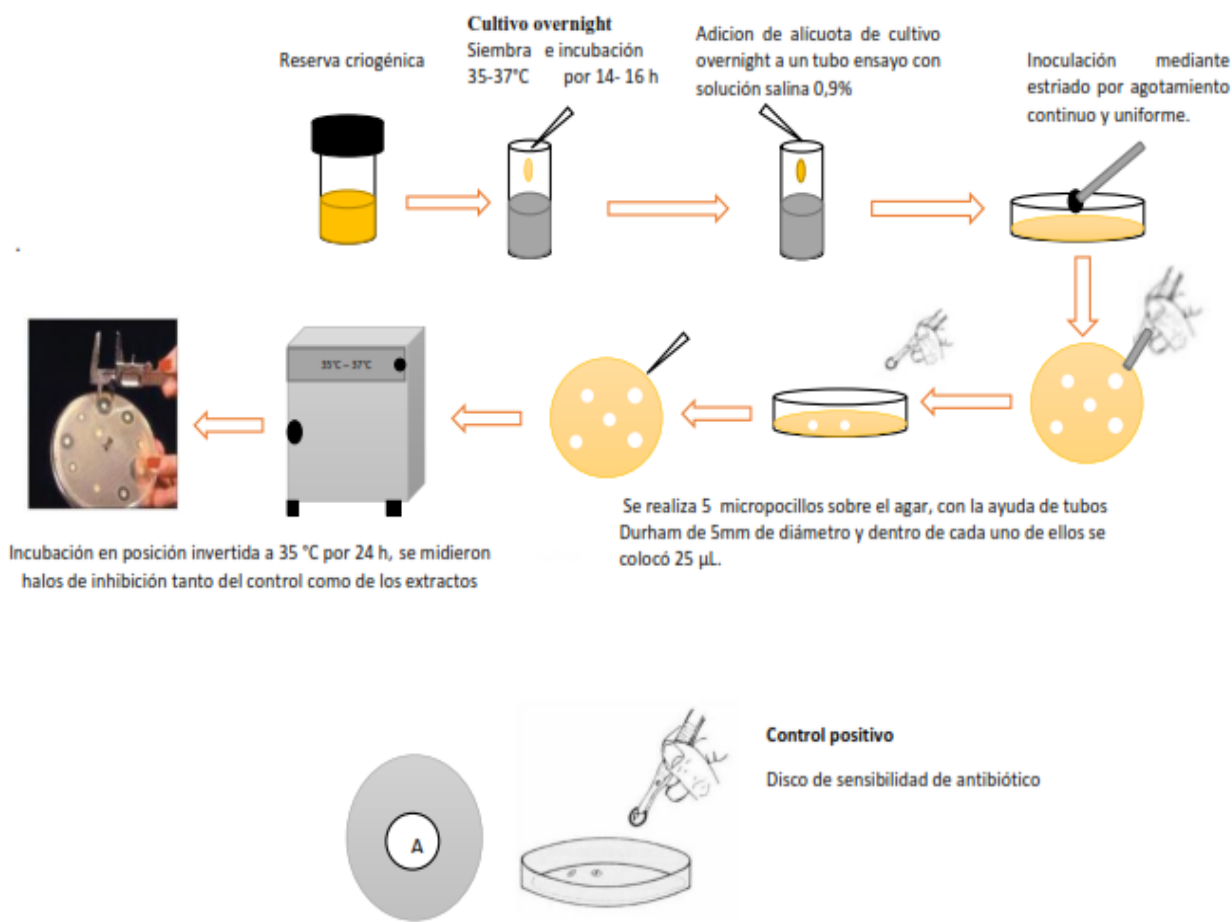
Del cultivo overnight, se tomó una alícuota del microorganismo de estudio y se colocó en un tubo que contenía 5 mL de suero fisiológico estéril al 0,9% hasta obtener una turbidez de 0,5 en la escala de Mc Farland, que corresponde a 10<sup>8</sup> ufc/mL.

#### 2.3.3.2. Siembra de las placas.

Con un hisopo estéril se inoculó de acuerdo a cada microorganismo en la superficie seca de las placas las cuales contenían agar Müller - Hinton (bacterias) y agar Sabouraud (hongos), se realizó estriado continuo en cuatro direcciones para asegurar un buen crecimiento.

Posteriormente se realizaron 5 pocillos de 5 mm con la ayuda de tubos Durham estériles se retiró el agar del pocillo con micro-espátulas, y se colocó 25 µL de extracto a probar. Se incubó las placas de forma invertida a 35 °C por 24 h. Finalmente se procedió a la medición de los halos de inhibición de los extractos y de los discos de sensibilidad. La siembra se la realizó por triplicado. En la **Figura 4** se muestra el esquema general de esta prueba.

Con la finalidad de evaluar la resistencia o sensibilidad de las cepas se utilizó como controles positivos: discos de Gentamicina 10 µg marca BBL™, Ampicilina 10 µg marca BBL™, Amikacina 30 µg marca BBL™ (bacterias) y voriconazol 1 µg marca OXOID y nistatina 100 U marca OXOID (hongos levaduriformes) colocados en la respectiva placa. Se empleó una caja de control por microorganismo.



**Figura 4.** Esquema del procedimiento de difusión en agar  
**Fuente:** La experimentación  
**Elaboración:** La autora

**2.3.3.3. Interpretación de resultados.**

La sensibilidad de las cepas microbianas frente a los extractos evaluados se mide por la presencia de halos de inhibición, observando que haya una zona traslúcida alrededor del pocillo (extracto a ensayar) y discos de sensibilidad. Posteriormente, se midió los halos de inhibición en milímetros con la ayuda de un calibrador. De acuerdo al documento M100 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing) del Instituto para estándares del laboratorio clínico (CLSI, 2017) los resultados obtenidos con los discos de antibióticos, se clasificó como sensible, intermedio y resistente.

## **2.3.4. Método de microdilución en caldo.**

### **2.3.4.1. Preparación de la microplaca.**

Se siguió los lineamientos descritos en el documento M7-A7 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically) del Instituto para estándares del laboratorio clínico (CLSI, 2006) para bacterias y el documento M27-A2 (Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts) del Instituto para estándares del laboratorio clínico (NCCLS, 2002) para hongos levaduriformes, con algunas modificaciones. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución doble seriada del siguiente modo: se colocó 180 µL de caldo Müller Hinton (bacterias) y Sabouraud (hongos) al primer pocillo y 100 µL a los pocillos restantes. Al primer pocillo se adicionó 20 µL del extracto a probar y se mezcló. Se continuó tomando 100 µL del primer pocillo y colocando al pocillo siguiente, se prosiguió este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas obteniendo concentraciones que varían desde 4000 µg/mL a 32,5 µg/mL. Se siguió el mismo procedimiento para el control de esterilidad, control negativo y control positivo.

### **2.3.4.2. Siembra de la microplaca.**

Una vez preparada la placa con el medio de cultivo y el extracto se inocula con 100 µL de la suspensión del inóculo (cultivo overnight + caldo Müller o Sabouraud), en todas las columnas a excepción de los controles de esterilidad; completando de esta forma un volumen final de 200 µL en la placa de cultivo ajustando la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  ufc/mL y la fúngica a  $2,5 \times 10^3$  ufc/mL. Se selló las placas y se incubó a 35 °C por un periodo de 18-24 horas. Como se observa en la **Figura 5**.

Controles: **Control de esterilidad:** 200 µL de caldo Müller o Sabouraud. **Control negativo:** cacao (180 µL caldo + 20 µL DMSO), café (180 µL caldo + 10 µL DMSO + 10 µL de agua destilada estéril). **Control positivo:** se utilizó 180 µL caldo + 20 µL Gentamicina® (1 mg/mL); 180 µL caldo + 20 µL Tetraciclina (5 mg/mL); 180 µL caldo + 20 µL Itraconazol (1 mg/mL).





**Figura 5.** Ilustración de la microplaca TC<sub>90</sub> hechas con 12 columnas y 8 filas (A - H).

**Fuente:** La experimentación

**Elaboración:** La autora

### 2.3.4.3. Interpretación de resultados.

La lectura de resultados se lo hizo por observación directa indicando la concentración mínima inhibitoria en la que el extracto inhibió el crecimiento antibacteriano o fúngico. Si los pocillos a los que se les colocó el extracto a ensayar se observaron transparentes (ausencia de crecimiento) se los reportó como activos; no activos cuando se visualizaron turbios, contrastando con el control negativo y de esterilidad. La dosis de los extractos se encuentra en el rango desde los 4000 µg/mL a 31,25 µg/mL.

En el caso de precipitación del extracto o turbidez no definida, la ausencia de crecimiento se valoró con el reactivo bromuro de tiazolil blue tetrazolium (MTT), adicionándose 20 µl de una solución de 25 mg/mL en los pocillos donde haya dificultad de interpretación. La placa nuevamente se incubó a 35° C durante 30 min, y la presencia de microorganismos se detecta por la reducción del MTT, el mismo que presenta una coloración violeta en el medio, indicativo de la presencia de microorganismos. (Pierre et al., 2014).

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Rendimiento de extractos

En la **Tabla 8** se muestra los rendimientos obtenidos de los extractos liofilizados de cacao en polvo y de la pulpa de café, en el **Anexo A** se muestra detalladamente los datos, utilizados para la obtención de los extractos.

**Tabla 8.** Rendimientos de cacao en polvo y subproducto de café (pulpa).

Solvente	Temperatura	Rendimiento (%)	
		Extracto de café	Extracto de cacao
EtOH	20°C	6,97	8,04
EtOH	40°C	8,75	20,06
EtOH	60°C	30,41	10,10
H <sub>2</sub> O	20°C	16,89	16,16
H <sub>2</sub> O	40°C	19,86	41,81
H <sub>2</sub> O	60°C	40,24	15,19
EtOH:H <sub>2</sub> O	20°C	10,00	12,53
EtOH:H <sub>2</sub> O	40°C	35,82	14,64
EtOH:H <sub>2</sub> O	60°C	38,90	20,10

**Fuente:** La experimentación

**Elaboración:** La autora

Los porcentajes de rendimiento oscilan entre 6,97% a 40,24% en extractos de subproducto de pulpa de café y, de 8,04% a 41,81% para cacao en polvo (Tabla 8). El mayor rendimiento se observó en el extracto acuoso a 40°C. De acuerdo a Do et al. ( 2014) el rendimiento depende de la temperatura, polaridad del solvente, pH, tiempo de extracción y composición de la muestra, además el rendimiento es mayor conforme se aumente la concentración de agua debido a que existe una mayor extracción de componentes y mejor solubilidad de proteínas y carbohidratos en agua que en etanol.

El rendimiento del extracto acuoso obtenido a 40°C a partir de cacao en polvo (41,81%) resultó superior a los demás tratamientos, de igual manera, el extracto etanólico a 40°C mostró un rendimiento superior (20,06%) al valor reportado por Ovaco & Pineda ( 2011) quien obtuvo extractos de EtOH (37°C) en cáscara y testa de cacao con rendimientos desde 2,5 a 3,4 %, lo cual evidencia que la temperatura influye de manera directa en el rendimiento.

Días (2011) reportó un rendimiento de 30,3% en pulpa de café utilizando EtOH al 100%, nuestros resultados se encuentran por debajo de lo reportado ya que se obtuvo un valor de 20,06 % esto pudo deberse a que el tiempo de maceración utilizado por Días (2011) fue mayor (24h). Maulide (2012) mencionó que existe un mayor rendimiento cuando se utiliza H<sub>2</sub>O como

solvente (19,1 a 20,8 %) mientras que en ETOH al 100% el rendimiento fue menor (6,25%); Chan, Soh, Tie, & Law (2011) reportó un rendimiento de 42% utilizando agua como solvente. Nuestro resultado concuerda con Chan et al. (2011) ya que se obtuvo un rendimiento de 40,24 % en H<sub>2</sub>O a 60°C, lo anterior demuestra que el agua nos permitió obtener los mejores rendimientos, ya que Rodríguez-Tudela et al. (2003) mencionaron que a temperaturas más altas se reduce la polaridad del agua, incrementando así su eficiencia de extracción y su capacidad para disolver compuestos menos polares, además aumentar la temperatura del agua reduce su tensión superficial y viscosidad lo que aumenta la velocidad de difusión y la velocidad de transferencia de masa durante la extracción (Chan et al., 2011).

### **3.2. Actividad antimicrobiana**

#### **3.2.1. Difusión en agar.**

En la **Tabla 9** se observa que los extractos de café no presentaron ninguna actividad inhibitoria frente a las cinco cepas evaluadas teniendo como halo de inhibición 5 mm correspondiente al diámetro del pocillo.

En los extractos de cacao EtOH a 20°C y EtOH: H<sub>2</sub>O a 20°C, 40°C y 60°C mostraron una actividad inhibitoria frente a *Micrococcus luteus* con halos de 6 y 7 mm respectivamente, (Tabla 9), reportándose como resistente frente a los extractos mencionados y en el **Anexo B** se muestra los valores por triplicado de los halos de inhibición.

**Tabla 9.** Tamaño del halo de la inhibición (mm) de extracto de subproducto de café y polvo de cacao, frente a cepas bacterianas de estudio mediante el método de difusión en agar.

Microorganismo	Difusión en Agar (mm)								
	EtOH			H <sub>2</sub> O			EtOH:H <sub>2</sub> O		
	20°C	40°C	60°C	20°C	40°C	60°C	20°C	40°C	60°C
	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 10240™	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>								
	6	5	5	5	5	5	7	7	7
	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>								
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>								
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>								
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>								
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>								
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43888™	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>								
	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>								
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>								
	5	5	5	5	5	5	5	5	5

5: diámetro del pocillo (mm)

**Fuente:** La experimentación

**Elaboración:** La autora

En este estudio todos los extractos de café no presentaron actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans* con un diámetro de pocillo de 5 mm, sin embargo Almeida, Farah, Silva, Nunan, & Glória (2006) reportó halos de inhibición 8,1 a 8,2 mm frente a *E.coli* en extractos de café tostado.

Duangjai et al.(2016) obtuvo halos de 10 mm frente a *E. coli* y 12 mm frente a *S. aureus* utilizando una concentración de 300 mg/mL de extracto de pulpa de café liofilizada, siendo la concentración uno de los factores que puede influenciar en la actividad antimicrobiana debido a que en nuestro estudio se utilizó una concentración más baja (80 mg/mL), Almeida et al. (2006) estudiaron la influencia de la concentración utilizada en el café sobre la actividad antimicrobiana, observándose que a medida que aumento la concentración aumento la

inhibición del crecimiento bacteriano; otros factores que pueden influenciar son : polaridad del disolvente, relación solvente : muestra y el tiempo de extracción (Handayani, 2000).

La respuesta de cada microorganismo frente a los extractos de café puede estar influenciada por las diferencias estructurales entre bacterias gramnegativas y grampositivas, específicamente en la membrana externa que se ha asociado con patrones de resistencia, al igual que se ve afectada por la variación de las concentraciones de los compuestos fitoquímicos presentes en las muestras de café (Del Castillo et al., 2007) los cuales se encuentran en mayor cantidad en el grano que en la pulpa.

En la **Tabla 9** y **Figura 6** se describen los resultados obtenidos en mm frente a *M. luteus*, de acuerdo a Burt et al. (2007) ; Galvez, López, Pulido, & Burgos ( 2014) en extractos naturales de plantas se considera resistentes (< 8 mm), sensibles ( 9 mm a 14 mm), muy sensibles (14 mm a 19 mm) y extremadamente sensibles (> 20 mm), debido a que en el estudio se obtuvieron halos de 6 a 7 mm en extractos de polvo de cacao se los clasificó como resistentes.

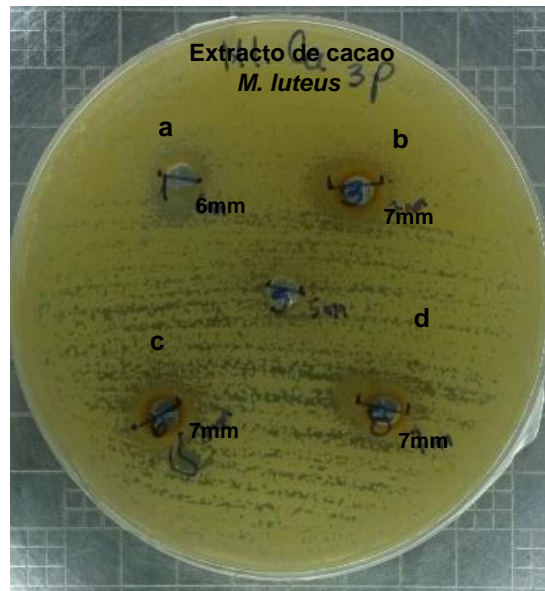
Nsor-atindana, Zhong, & Mothibe (2012) realizaron estudios en extractos de cáscara de cacao utilizando diferentes disolventes: acetona, metanol, etanol y agua; frente *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* y *B. cereus*; presentando en extractos etanólicos un halo de inhibición de 10,98 a 12,21 mm y en extracto acuoso de 9,19 a 9,87 mm utilizando una concentración de 100 mg/mL. Sucuzhañay reportó halos parecidos en *Streptococcus mutans* de 8 a 10 mm. De acuerdo a Hernández, Cubillos-Hinojosa, & Milian (2012) los resultados obtenidos mediante el método de difusión en agar pueden verse influenciados por los siguientes factores: cantidad de extracto utilizado, fase de crecimiento en la que se encuentren las cepas y la cantidad específica utilizada del microorganismo.

Nuestros resultados se encuentran por debajo de lo reportado por Nsor-atindana et al. (2012); Sucuzhañay-Mora & Álvarez-Velazco (2016); pero concuerdan con Mariani, Jaimes, & Fernandez-Da Silva (2010) quienes reportaron halos de 6 a 8 mm frente a *S. mutans* en extractos acuosos de semilla de cacao; la actividad antimicrobiana puede variar dependiendo del contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos como los polifenoles, flavan-3ols, la epicatequina y la catequina (Orihuela, 2016), asociándolos con actividad antimicrobiana ya que actúan específicamente contra la membrana de bacterias grampositivas dando como resultado la pérdida de la estructura celular y la muerte celular (Koech et al., 2014).

De acuerdo a Mirzapour et al. (2012) la mezcla etanol: agua resultó la mejor para la extracción de compuestos bioactivos como los polifenoles (relacionados con actividad antimicrobiana), debido a que se obtuvieron los mejores resultados utilizando esta mezcla,

debido a que cuando se utiliza etanol con un volumen menor al 60 %, la extracción se incrementa, pero si el solvente supera el 60% la extracción de estos compuestos disminuye; es por ello que no hubo inhibición cuando se utilizó etanol al 100% (Mirzapour et al., 2012). Se cree que los polifenoles son los principales compuestos presentes en el cacao con actividad antimicrobiana, debido a que poseen efectos contra bacterias y hongos además de su capacidad antioxidante (Jail & Ismail, 2008). Estos resultados tienen coherencia con los datos obtenidos en esta investigación ya que los halos obtenidos corresponden a los extractos en los que se utilizó mezcla: etanol: agua (50:50), se los considera los menos tóxicos desde el punto de vista alimentario a la hora de incorporarlos en alimentos (Pinelo, Rubilar, Jerez, Sineiro & Núñez, 2005).

En la **Figura 6** se muestra los diámetros de halos de inhibición obtenidos en extractos de polvo de cacao frente a *M. luteus*, mediante la técnica de difusión en agar.



**Figura 6.** Halos de inhibición de extracto de polvo de cacao, **a.** ETOH a 20°C, **b.** ETOH: H<sub>2</sub>O a 20°C, **c.** ETOH: H<sub>2</sub>O a 40°C, **d.** ETOH: H<sub>2</sub>O a 60°C.

**Fuente:** La experimentación

**Elaboración:** La autora

En la **Tabla 10** se detalla los halos de inhibición obtenidos para los controles positivos mediante la técnica de difusión en agar para las 5 cepas estudiadas, los cuales se compararon con datos bibliográficos para corroborar la sensibilidad de las cepas (Anexo C).

**Tabla 10.** Halos de controles positivos mediante la técnica de difusión en agar.

Discos	Naturaleza del disco	Microorganismo	Halos obtenidos (mm)		Halos de inhibición referenciales*		
					S	I	R
Gentamicina (10µg)	Antibiótico	<i>S. aureus</i>	19	S	≥ 15	13 -14	≤ 12
		<i>E. coli</i> O157:H7	12	R	≥ 15	13 -14	≤ 12
		<i>E. faecalis</i>	9		NR	NR	NR
		<i>M. luteus</i>	25		NR	NR	NR
Ampicilina (10µg)	Antibiótico	<i>S. aureus</i>	43	S	≥ 29	NR	≤ 28
		<i>E. coli</i> O157:H7	22	S	≥ 17	14 -16	≤ 13
		<i>E. faecalis</i>	28	S	≥ 17	NR	≥16
		<i>M. luteus</i>	42	NR	NR	NR	NR
Amikacina (30µg)	Antibiótico	<i>S. aureus</i>	18	S	≥ 17	14 -16	≤ 13
		<i>E. coli</i> O157:H7	19	S	≥ 17	14 -16	≤ 13
		<i>E. faecalis</i>	6		NR	NR	NR
Voriconazol (1µg)	Antifúngico	<i>M. luteus</i>	28		NR	NR	NR
		<i>C. albicans</i>	7	R	≥ 17	14 -16	≤ 13
Nistatina (100U)	Antifúngico	<i>C. albicans</i>	16	S	≥ 15	10 -14	sin halo

**S:** sensible

**R:** resistente

**I:** Intermedio

**NR:** No reporta

\* M100, (CLSI, 2017) (antibiótico)

\* Maroszynska (2013) (antifúngico)

**Fuente:** La experimentación

**Elaboración:** La autora

De acuerdo a los resultados expuestos se verificó que *S. aureus* es sensible a los tres antibióticos probados, *E. coli* demuestra sensibilidad a Ampicilina y Amikacina y resistencia a Gentamicina; *E. faecalis* presentó únicamente sensibilidad a Ampicilina en Gentamicina y Amikacina no se reportó sensibilidad o resistencia en el documento M100 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing) del Instituto para estándares del laboratorio clínico (CLSI, 2017). *C. albicans*, demostró resistencia frente a Voriconazol, pero sensibilidad



frente a Nistatina (Maroszynska 2013). En *M. luteus* en el documento M100 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing) del Instituto para estándares del laboratorio clínico (CLSI, 2017) no se encontró información sobre la sensibilidad ante distintos antibióticos, de acuerdo a Gülçin et al.( 2003), la cepa presentó sensibilidad frente a Ofloxacina (5µg) y Netilmicina (30µg) con halos de inhibición de 20 y 22 mm respectivamente.

### 3.2.2. Microdilución en caldo.

Los extractos de café y cacao no presentaron actividad inhibitoria frente a *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*. Los extractos de cacao EtOH 20°C y EtOH – H<sub>2</sub>O a 20°C, 40°C y 60°C, presentaron una CMI de 4000 µg/mL frente a *M. luteus*, estos resultados concuerdan con el método de difusión en placa. En cuanto a los hongos levaduriformes, *C. albicans* no presentó actividad inhibitoria en los extractos de café y cacao (Tabla 11), en el **Anexo D** se muestra detalladamente los resultados obtenidos frente a cada una de las cepas estudiadas.

**Tabla 11.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de cacao en polvo frente a las cepas ensayadas mediante el método de microdilución en caldo.

Microorganismo	Extracto	CMI (µg/mL)
<i>Micrococcus luteus</i> , ATCC® 10240™	EtOH	4000
	EtOH: H <sub>2</sub> O	4000
	EtOH:H <sub>2</sub> O	4000
	EtOH:H <sub>2</sub> O	4000

**Fuente:** La experimentación

**Elaboración:** La autora

Según Aligiannis et al. (2001), consideraron que una concentración minimiza es fuerte: CMI < 500 µg/mL, inhibidores moderados: CMI de 600 a 1500 µg/mL, inhibidores débiles: CMI > 1600 µg/mL), el extracto de polvo de cacao se consideró como un inhibidor débil frente a *M. luteus* debido a que se obtuvo un valor de CIM de 4000 µg /mL.

En este estudio no se obtuvo resultados de concentración mínima inhibitoria en extractos de pulpa liofilizada de café frente a las cepas estudiadas , sim embargo Pruthviraj et al. (2011) evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de grano de café frente a microorganismos gramnegativos: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y grampositivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* obteniendo valores de CMI de 65,5 a 250,0 µg/mL. Monente (2015) realizó estudios en subproductos de bebida de café obteniendo una CMI de 400 a 4000 µg/mL contra *E. coli*, utilizando una concentración de 122 mg/mL, la diferencia en cuanto a los resultados obtenidos pueden estar relacionados por la diferencia estructural entre las bacterias gramnegativas y grampositivas, además puede afectar la variación de las concentraciones de los compuestos fitoquímicos presentes en los extractos de café (Monente 2015).

Lou et al. (2011); Bibek & Bhunia (2010), los granos de café poseen una considerable cantidad de ácidos hidroxycinámicos específicamente los grupos hidroxilo de los ácidos clorogénicos los cuales son principales responsables de la actividad antimicrobiana, esto debido a su capacidad de atravesar la membrana celular especialmente en bacterias grampositivas debido a que tiene una estructura simple constituida por un monocomplejo fácilmente hidrolizable, pared celular poco selectiva y carece de la propiedad de barrera.

Ariza et al. (2014) reportaron una actividad antimicrobiana en extractos etanólicos de cacao obteniendo una CMI de 835 µg /mL frente a *Escherichia coli*. Nsor-atindana et al. (2012) obtuvieron una CMI de 1870 µg/mL en extractos etanólicos y metanólicos de cacao frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. ; *Bacillus cereus* y 3750 µg/mL en extractos acuosos frente a las cuatro cepas mencionadas anteriormente, utilizando una concentración de 100mg/mL, los resultados obtenidos no concuerdan con nuestros resultados ya que en extractos acuosos no se obtuvo resultados de CMI, mientras que en extractos etanólicos se obtuvo una CMI de 4000 µg/mL.

En los estudios reportados por Ariza et al. (2014) & Nsor-atindana et al. (2012) utilizaron extractos de polvo de cacao sin liofilizar debido a que King et al (2001) & Chang et al (2006) afirma que la liofilización deterioró las propiedades antioxidantes de los extractos, debido a que existe una mayor superficie expuesta permitiendo mayor contacto con el oxígeno con lo cual hay una mayor oxidación del extracto liofilizado.

Todorovic, Milenkovic, Vidovic, Todorovic, & Sobajic ( 2017) reportaron una CMI de 500 a 2500 µg/mL para extractos hexánicos de polvo de cacao evaluados para bacterias grampositivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*; gramnegativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony*. El extracto hexánico presentó una CMI de 5000 µg/mL frente a *C.albicans*. De acuerdo a Cuéllar (2010) ; Paredes & Clemente (2005) la actividad antimicrobiana se vio afectada por la baja concentración de compuestos fenólicos, teobromina, cafeína y teofilina los cuales están estrechamente relacionados con actividad antimicrobiana; otros factores que pueden afectar es la concentración utilizada , evaporación de solventes, y métodos usados para la obtención de extractos.

En la **Tabla 12** se detallan los controles positivos utilizados frente a las 5 cepas de estudio para comprobar la sensibilidad de las cepas frente a los antibióticos y antifúngicos utilizados, los resultados obtenidos se analizaron con datos bibliográficos.

**Tabla 12.** Controles positivos obtenidos mediante microdilución en caldo.

Controles positivos	Naturaleza de los controles	Microorganismo	CMI obtenido		Valores de CMI referenciales*		
			( $\mu\text{g/mL}$ )		S	I	R
Gentamicina (1mg/mL)	Antibióticos	<i>S. aureus</i>	0,39	S	$\leq 4$	8	$\geq 16$
		<i>E. coli</i>	0,39	S	$\leq 4$	8	$\geq 16$
		<i>M. luteus</i>	0,39	NR	NR	NR	NR
Tetraciclina (5mg/mL)		<i>E. faecalis</i>	1,95	S	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Itraconazol (1mg/mL)	Antifúngico	<i>C. albicans</i>	25	R	$\leq 0,125$	NR	$\geq 1$

**S:** sensible

**R:** resistente

**I:** Intermedio

**NR:** No reporta

\* M100, (CLSI, 2017) (antibiótico)

\* Arian (2007) (antifúngico)

**Fuente:** La experimentación

**Elaboración:** La autora

*S. aureus*, *E. coli* presentaron sensibilidad frente a Gentamicina y *E. faecalis* presentó sensibilidad frente a Tetraciclina, para *M. luteus* no se obtuvo sensibilidad o resistencia en el documento M100 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing) del Instituto para estándares del laboratorio clínico (CLSI, 2017) frente a Gentamicina, pero Olajuyigbe & Coopoosamy (2014) reportó una CMI de 1,25  $\mu\text{g/mL}$  de Ciprofloxacina frente a *M. luteus* y *C. albicans* se mostró resistente frente a itraconazol.

## CONCLUSIONES

- ❖ De los tratamientos aplicados, la extracción con agua a 60°C y 40°C permitió obtener los mejores rendimientos, con valores de 40,84 g/mL y 41,81 g/mL, respectivamente.
- ❖ Los extractos etanólicos, acuosos y mezcla etanol: agua en proporción 1:1 de subproducto de café no presentaron actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* y *C. albicans* mediante la técnica de difusión y microdilución en caldo.
- ❖ Los extractos de cacao etanólicos a 20°C y mezcla etanol: agua en proporción 1:1 a 20°C, 40°C y 60°C presentaron halos de inhibición de 6 a 7 mm, mediante la técnica de difusión y una CMI de 4000 µg/mL mediante el método de microdilución en caldo, frente a *Micrococcus luteus*.

## RECOMENDACIONES

- ❖ Para un próximo estudio evaluar otras cepas que estén relacionadas con la alteración de alimentos y por ende afecten a la industria alimentaria.
- ❖ Utilizar otros métodos de extracción como fluidos supercríticos para la obtención de extractos con un mayor contenido de compuestos fenólicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abad, A. X. (2009). Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe: *piper escuadoreense* ( matico), *lepechinia mutica Benth* ( Turuyante), *fuschia ayavancensis* ( pena-pena), *niphogeto*. Universidad Técnica Particular de Loja. Retrieved from <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/1862>
- Agostini-costa, T. S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (n.d.). Secondary Metabolites.
- Almeida, A. A., Farah, A., Silva, D., Nunan, E., & Glória, M. B. (2006). Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds against Enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1–7. <http://doi.org/10.1021/jf0617317>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5–16. [http://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](http://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
- Arévalo, G.; Zúñiga, C.; Baligar, V., Dinámica poblacional fungosa asociada a la rizosfera de un sistema tradicional de cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Perú.2007, 1-7.
- Arikan, S. (2007). Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology*, 45(November), 569–587. <http://doi.org/10.1080/13693780701436794>
- Ariza, B. T. S., Mufida, D. C., Fatima, N. N., Hendrayati, T. I., Wahyudi, T., & Misnawi. (2014). In vitro antibacterial activity of cocoa ethanolic extract against *Escherichia coli*. *International Food Research Journal*, 3(21), 7.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Koraichi, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <http://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Beckett, S. T. (2008). The Science of Chocolate. *Cambridge: The Royal Society of Chemistry*, 39-57.
- Bibek, R., & Bhunia, A. R. U. N. (2010). Fundamentos de microbiología de los alimentos. *Editorial Mc Graw Hill*.
- Bonilla, P. (2011). “Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de carrasquilla (*Berberis hallii*) sobre *Escherichia coli* ATCC N° 9637, *Candida albicans* ATCC N°10231, *Pseudomona aeruginosa* ATCC N° 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC N°6538.” Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

- Borges, P., Ortega, A., Roncal, E., & Esther, R. (2008). Obtención a escala piloto de un extracto de café, *18*(3), 53–57.
- Burt, R., Voltarelli, J., Couri, C., Stracieri, A., Oliveira, M., Moraes, D. & Pieroni, F. Autólogo no mieloablativo de células madre hematopoyéticas en el diagnóstico reciente de diabetes mellitus tipo 1. *Jama*, *297*(14), 2007, p.1568-1576.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7 [ISBN 1-56238-587-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
- Chan, E. W. C., Soh, E. Y., Tie, P. P., & Law, Y. P. (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green , black , and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research*, *3*(4), 266–273. <http://doi.org/10.4103/0974-8490.89748>
- Chang, Ching-Hui; Hsing-Yu Lin; Chi-Yue Chang & Yung- Chuan Liu. 2006. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of food engineering*. Vol. 77, 478-485.
- Condezo, O. (2011). *Polifenoles totales, antocianinas v capacidad antioxidante (opph y peroxilo) en granos de cacao (Theobroma cacao L.) comercial de tingo maria y tocacha*". Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Coronel, M., & Marín, A. (2010). *EStudio del café especial ecuatoriano*. Fundación Universitaria Iberoamericana.
- Crescente, O., Acosta, M., Guevara, M., & Estaba, A. (1998). Aprovechamiento de los desechos de cacao (*Theobroma Cacao L.*), *11*(2), 28–30.
- Cuéllar, O. (2010). *Obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- Del Castillo, M. D., Ferrigno, A., Acampa, I., Borrelli, R. C., Olano, A., Martínez-Rodríguez, A., & Fogliano, V. (2007). In vitro release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxy-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. *Journal of Cereal Science*, *45*(3), 327–334. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.09.005>

- Días, A. (2011). “ *Pulpa de café : Coffea arabica L : Como fuente alternativa de antioxidantes* .” Universidad Técnica Particular de Loja.
- Do, Q., Angkawijaya, A., Tran-Nguyen, P., Huynh, L., Soetaredjo, F., Ismadji, S. I., & Ju, Y.-H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Domingo, D., & López, M. (2013). Plantas con acción antimicrobiana. *Esp Quimioterap*, 16(4), 385–393.
- 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(4), 324–331. <http://doi.org/10.1016/j.imr.2016.09.001>
- Galvez, A., López, L., Pulido, R., & Burgos, M. (2014). Natural Antimicrobials for Food Biopreservation. *Food Biopreservation. New York.*, 3–15. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2029-7>
- González, L. J., Martínez, F. N., Rossi, L., Tornese, M., & Troncoso, A. (2010). Enfermedades transmitidas por alimentos: Análisis del riesgo microbiológico. *Chil Infect*, 27(6), 513–524.
- Guil-Guerrero, J. L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J. C., Carlosama-Yepez, M., & Ruales, P. (2016). Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. *Livestock Science*, 189, 32–49. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.04.021>
- Granados, R., (2003). Microbiología: Bacteriología. Características y clasificación Bacteriana, Virología. Características y Técnica Bioquímicas., Tomo I., Madrid- España., Editorial Paraninfo S.A., Pp. 1-10.
- Gülçin, I., Münir, O., Ekrem, K., & Irfan, Ö. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise ( *Pimpinella anisum* L .) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371–382. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00098-0](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00098-0)
- Günter, K. (2003). Taxonomy , ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 88, 123–131. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00175-2](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00175-2)
- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter(U.P.C)*, (122), 35–41.



- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Handayani, B. (2000). Study and characterization of of antibacterial compounds of arabica coffee berry pulp, 1–97.
- Hernández, J. L., Cubillos-Hinojosa, J. G., & Milian, P. E. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium spp.*, asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana De Microbiología Tropical*, 2(2), 51–62.
- Herrera, Marco Luis. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34(Supl.), 33-41. Recuperado en 05 de agosto de 2017, de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101785461999000100010&lng=pt&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101785461999000100010&lng=pt&tlng=es).
- Instituto de promoción de exportaciones e inversiones(PRO ECUADOR). (2013). Análisis del Sector Cacao y elaborados. *Pro Ecuador*, 42. Retrieved from [http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2013/08/PROEC\\_AS2013\\_CACAO.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf)  
<http://www.proecuador.gob.ec/compradores/oferta-exportable/cacaoyelaborados>.
- Jalil, A. M. M., & Ismail, A. (2008). Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*, 13(9), 2190–2219. <http://doi.org/10.3390/molecules13092190>
- King, V. An-Erl, Chia- Fang Liu & Yi-Ling Liu. 2001. Chlorophyll stability in spinach dehydrated by freeze-drying and controlled low temperature vacuum dehydration. *Food research International*. Vol. 34, 167-175.
- Koech, K. R., Wachira, F. N., Ngure, R. M., Orina, I. A., Wanyoko, J. K., Bii, C., & Karori, S. (2014). Antifungal activity of crude tea extracts. *African Journal of Agricultural Research*, 8(19), 2087–2089. <http://doi.org/10.5897/AJAR2013.6742>
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.
- Lazcano-Sánchez, E., Trejo-Márquez, M., Vargas-Martínez, M., & Pascual-Bustamante, S. (2015). Contenido de fenoles, cafeina y capacidad antioxidante de granos de café verdes y tostados de diferentes estados de México. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 24(4), 293–298.

- Lecumberri, E., Mateos, R., Ramos, S., Alía, M., Rúperez, P., & Goya, L. (2006). Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación Effect on the antioxidant capacity of, *21*(5), 622–628.
- Llop, A., Valdés-Dapena, M., Zuazo, J., Almaza, C., Cisneros, E., Delgado, G., ... Ginebra, O. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas*. La Habana.
- Mariani, M., Jaimes, G., & Fernandez-Da Silva, R. (2010). Artículo Original. *ODOUS CIENTÍFICA*, *11*(1), 15–22.
- Maroszyńska, M., Kunicka-styczyńska, A., Rajkowska, K., & Maroszyńska, I. (2013). Antibiotics sensitivity of *Candida* clinical and food-borne isolates \*. *Biochimica Polonica*, *60*(4), 719–724.
- Martínez Flores, S., Gallego Gonzales, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, *XVII*(6), 271–278.
- Maulide, R. (2012). *Obtención y caracterización de extractos de Momordica balsamina L.* Universidad Autonoma de Madrid.
- Maydata, B. (2002). Chocolate , Polifenoles y Protección a la Salud. *Acta Farm. Bonaerense*, *21*(2), 149–152.
- Medina, J., Ortiz, M. ., & Coronel, O. . (n.d.). Operaciones Poscosecha -, 78.
- Mensa, J., Gatell, J., García-Sánchez, J., Letang, E., López, E., & Marco, F. (2004). *Guía de terapéutica antimicrobiana* (14ava ed.). Barcelona- España: Editorial Masson S.A.
- Mirzapour, M., Hamedi, M., Rahimipanah, M., & Shockpour, N. (2012). Walnut leaves- influence of different extraction methods on the total phenol and flavonoid contents. *AgroFOOD industry Hi Tech*, *23*(3), 27-30. Recuperado de [teknoscienze.com](http://teknoscienze.com) (Diciembre, 2015)
- Monente, J. (2015). *Spent coffee as a new source of bioaccessible and bioactive compounds with antimutagenic and antimicrobial activity*. Universidad de Navarra.
- Monteros, A. (2016). Rendimientos de café grano seco en el ecuador 2016, *305*, 12.
- NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4)
- Nsor-atindana, J., Zhong, F., & Mothibe, K. J. (2012). Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa ( *Theobroma cacao L.* ) Bean Shells, *11*(7), 574–579.

- OMS. (2015). Enfermedades de transmisión alimentaria
- Olajuyigbe, O. O., & Coopoosamy, R. M. (2014). Influence of First-Line Antibiotics on the Antibacterial Activities of Acetone Stem Bark Extract of *Acacia mearnsii* De Wild . against Drug-Resistant Bacterial Isolates. *Hindawi Publishing Corporation*, 1–9. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2014/423751>
- Orihuela, J. (2016). *Actividad inhibitoria del extracto etanólico de Theobroma cacao L . sobre el crecimiento y adherencia in vitro de Streptococcus mutans a esmalte dentario*. Universidad Mayor de San Marcos.
- Ovaco, D., & Pineda, I. (2011). *Los residuos de cacao (Theobroma cacao L.) COMO FUENTE Alternativa de antioxidantes*”. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Paredes Salido, F., & Clemente Fernandez, A. (2005). Polifenoles de aplicación en Farmacia: Metabolismo y acción biológica. *Offarm*, 24, 85-94
- Pardi, G & Cardozo, E.I. 2002. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de *candidiasis* bucal. *Acta odontol. Venez.*, 40. 9-17.
- Pierre, S., Gatsing, D., Teke, G., Cheseto, X., Talom, B., Kuate, J., & Torto, B. (2014). Chemical constituent, antibacterial and antioxidant activity of crude extract and oil fraction of *L. Abyssinica*. *International Journal of Phytomedicine*, 6(2), 170–176. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2012.24074%5Cnhttp://www.SciRP.org/journal/aim>
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111–2117. doi: 10.1021/jf0488110
- Pruthviraj, P., Suchita, B., Shital, K., & Shilpa, K. (2011). Evaluation of antibacterial activity of Caffeine. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2(4), 1354–1357. [http://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00456-3](http://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00456-3)
- Quiñones-galvez, j., hernández, m., quirós, y., capdesuñer, y., & sánchez, r. (2016). factores que controlan el contenido de fenoles en el cultivo de callos de *Theobroma cacao L*. *Red de Revistas Científicas de América Latina*, 37, 118–126. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.4038.1047>
- Rea, V. (2011). “Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) Como potencial bioconservador en la carne de trucha.” Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Rodríguez. (2002). Manejo de residuos en la agroindustria cafetera.seminario internacional gestión integral de residuos sólidos y peligrosos, siglo xxi manejo, 1–10.
- Rodríguez-Tudela, J., Barchiesi, F., Bille, J., Chyssanthou, E., Cuenca-Estrella, D., Donnelly, J., ... Verweij, P. (2003). Method for the determination of minimum inhibitory concentration ( MIC ) by broth dilution of fermentative yeasts. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(8), 1–8.
- Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170.
- Rosas, K. (2014). “ Estudio genético molecular de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina aisladas en El Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen Red Essalud – Lima , Perú ” V. Universidad Mayor de San Marcos.
- Rubio, D. (2013). *Estudio de la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano de los adhesivos autograbantes frente a gérmenes de la cavidad oral*. Universidad Complutense de Madrid.
- Sánchez, I., & Rubio, A. (2010). ATención farmacéutica en la enfermedad periodontal (y II). *Offarm*, 29(y II), 62–67.
- Sotelo, L., Alvis, A., & Arrázola, G. (2015). Evaluación de epicatequina , teobromina y cafeína en cáscaras de cacao ( *Theobroma cacao* L .), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124–134. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3751> Evaluación
- Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, K., Yokota, T., Cavin, C., ... Crozier, A. (2009). Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans : Identification of Biomarkers of Coffee Consumption ABSTRACT : *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 37(8), 1749–1758. <http://doi.org/10.1124/dmd.109.028019>.contains
- Suczhañay- Mora, M., & Álvarez-Velazco, P. (2016). Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao ( *Theobroma cacao* ) sobre cepa de *Streptococcus Mutans* : Estudio in vitro. *Odontología*, 19(2), 35–41.
- Tapia, J. (2012). “*Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y subextractos clorofórmico y etéreo de Senna multijuga, Tagetes zipaquirensis, y Coursetia dubia.*” Escuela Superior Politécnica De Chimborazo Facultad De Ciencias Escuela.

- Todorovic, V., Milenkovic, M., Vidovic, B., Todorovic, Z., & Sobajic, S. (2017). Correlation between Antimicrobial , Antioxidant Activity , and Polyphenols of Alkalized / Nonalkalized Cocoa Powders. *Journal of Food Science*, 0(0), 8. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.13672>
- Vodnar, D. C., Călinoiu, L. F., Dulf, F. V., Ștefănescu, B. E., Crișan, G., & Socaciu, C. (2017). Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. *Food Chemistry*, 231, 131–140. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.131>
- Waizel-haiat, S., Waizel-bucay, J., Magaña-serrano, J. A., Campos-bedoya, P., & San Esteban-sosa, J. E. (2012). Cacao y chocolate : seducción y terapéutica, 57(3), 236–245.

## **ANEXOS**

**Anexo A.** Valores iniciales para la obtención de extractos de subproducto de café y polvo de cacao.

**A1. Datos iniciales, peso del subproducto (pulpa de café), cantidad de solvente utilizado, peso del subproducto liofilizado.**

n°	Solvente (%)	Temperatura (°C)	Datos			Rendimiento (%)
			P. Subproducto (g)	Volumen a preparar (mL)	P muestra(g) Liofilizada	
1	EtOH	20	75,0066	1000	5,23007	6,97
2	EtOH	40	75,0059	1000	2,55171	8,75
3	EtOH	60	15,2345	200	7,29474	30,41
4	H <sub>2</sub> O	20	75,0059	200	6,55967	16,89
5	H <sub>2</sub> O	40	18,7561	250	6,08179	19,86
6	H <sub>2</sub> O	60	15,1125	200	5,46257	40,24
7	EtOH:H <sub>2</sub> O	20	15,3456	200	4,63303	10,00
8	EtOH:H <sub>2</sub> O	40	15,2505	200	1,53461	35,82
9	EtOH:H <sub>2</sub> O	60	18,7525	250	3,72417	38,90

**A2. Datos iniciales, peso de polvo de cacao, cantidad de solvente utilizado, peso del polvo de cacao liofilizado.**

n°	Solvente (%)	Temperatura (°C)	Datos			Rendimiento (%)
			P. de polvo de cacao(g)	Volumen a preparar (mL)	P muestra(g) Liofilizada	
1	EtOH	20	15,01836	300	1,20760	8,04
2	EtOH	40	10,0054	200	1,32019	20,06
3	EtOH	60	10,0465	300	1,64670	10,10
4	H <sub>2</sub> O	20	8,1701	160	2,00756	16,16
5	H <sub>2</sub> O	40	8,5276	170	1,55290	41,81
6	H <sub>2</sub> O	60	10,2204	200	1,10307	15,19
7	EtOH:H <sub>2</sub> O	20	8,1924	160	1,01452	12,53
8	EtOH:H <sub>2</sub> O	40	7,5324	170	1,02647	14,64
9	EtOH:H <sub>2</sub> O	60	8,1946	160	3,56553	20,10

**Anexo B.** Datos obtenidos del tamaño de halo de inhibición de extractos de subproducto de café y polvo de cacao mediante la técnica de difusión en agar.

Microorganismo	Difusión en Agar (mm)																		Control positivo
	Etanol						Agua						Etanol:Agua						
Dosis: 80mg/mL	20°C			40°C			60°C			20°C			40°C			60°C			
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 10240™	Café ( <i>Coffea arabica</i> )																		26 <sup>a</sup> , 42 <sup>b</sup> , 25 <sup>c</sup> , 28 <sup>d</sup>
	Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L)																		26 <sup>a</sup> , 42 <sup>b</sup> , 25 <sup>c</sup> , 28 <sup>d</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> sub sp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	Café ( <i>Coffea arabica</i> )																		24 <sup>a</sup> , 43 <sup>b</sup> , 19 <sup>c</sup> , 18 <sup>d</sup>
	Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L)																		24 <sup>a</sup> , 43 <sup>b</sup> , 19 <sup>c</sup> , 18 <sup>d</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	Café ( <i>Coffea arabica</i> )																		14 <sup>a</sup> , 28 <sup>b</sup> , 9 <sup>c</sup> , 6 <sup>d</sup>
	Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L)																		14 <sup>a</sup> , 28 <sup>b</sup> , 9 <sup>c</sup> , 6 <sup>d</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43888™	Café ( <i>Coffea arabica</i> )																		22 <sup>a</sup> , 22 <sup>b</sup> , 12 <sup>c</sup> , 20 <sup>d</sup>
	Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L)																		22 <sup>a</sup> , 22 <sup>b</sup> , 12 <sup>c</sup> , 20 <sup>d</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	Café ( <i>Coffea arabica</i> )																		7 <sup>e</sup> , 16 <sup>f</sup>
	Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L)																		7 <sup>e</sup> , 16 <sup>f</sup>

5: diámetro del pocillo (mm)

a. Control positivo: Gentamicina (1mg/mL)

b. Control positivo: Discos de Ampicilina (10 µg)

c. Control positivo: Discos de Gentamicina (10 µg)

d. Control positivo: Discos de Amikacina (30 µg)

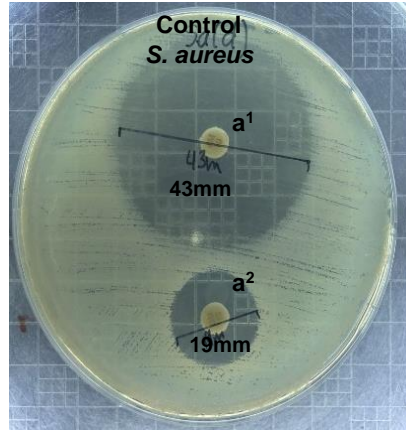
e. Control positivo: Discos de Voriconazol (1 µg)

f. Control positivo: Discos de Nistatina (100 U)

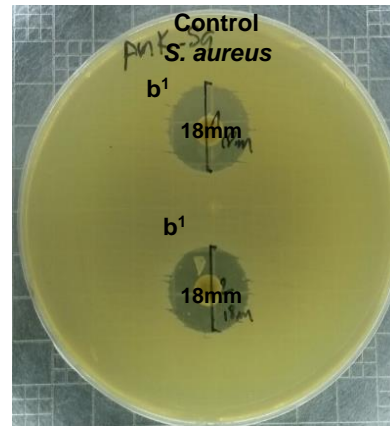


**Anexo C.** Controles positivos realizados en la técnica de difusión

**Diámetros de halos de inhibición (mm) de *S. aureus***



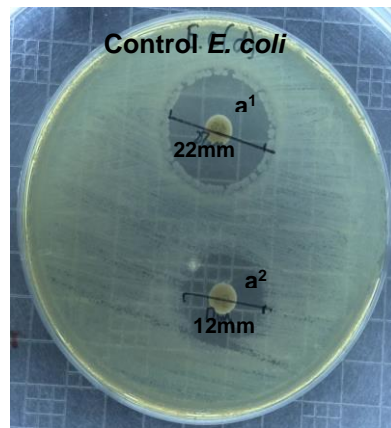
**a.**



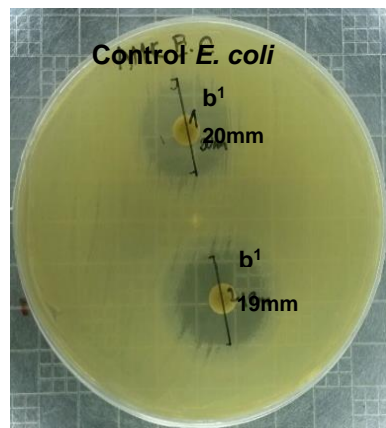
**b.**

Halos de inhibición de *S. aureus* frente a discos de sensibilidad: **a<sup>1</sup>** (ampicilina), **a<sup>2</sup>** (gentamicina), **b<sup>1</sup>** (amikacina).

**Diámetros de halos de inhibición (mm) de *E. coli***



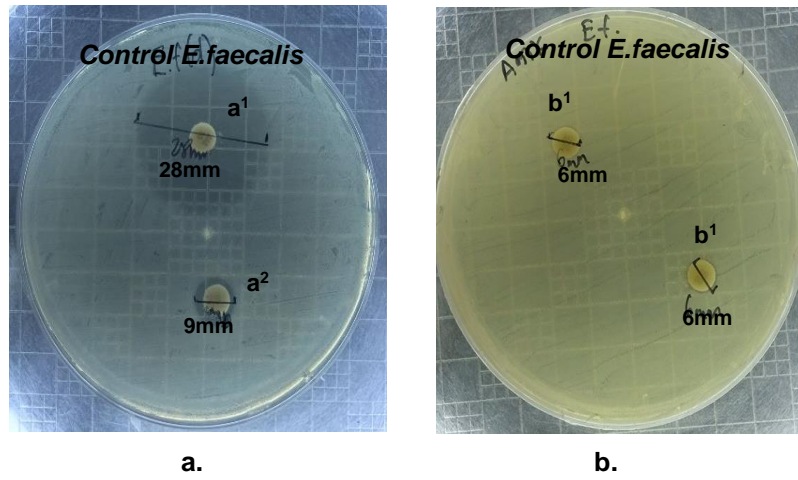
**a.**



**b.**

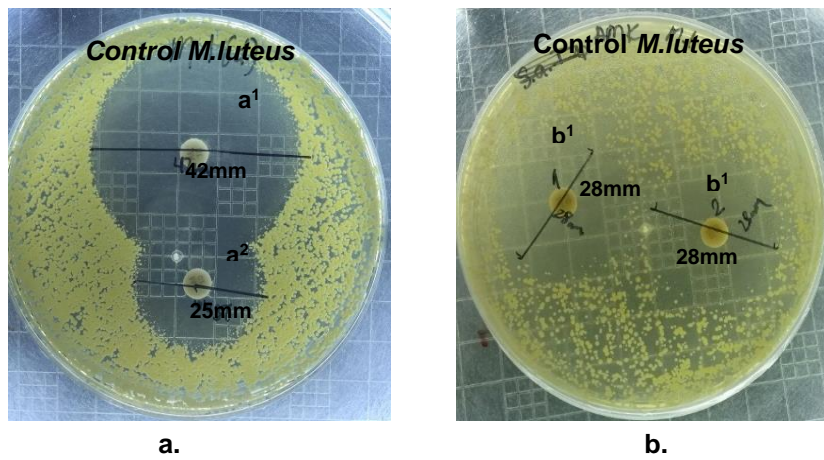
Halos de inhibición de *E. coli* frente a discos de sensibilidad: **a<sup>1</sup>** (ampicilina), **a<sup>2</sup>** (gentamicina), **b<sup>1</sup>** (amikacina).

### Diámetros de halos de inhibición (mm) de *E. faecalis*



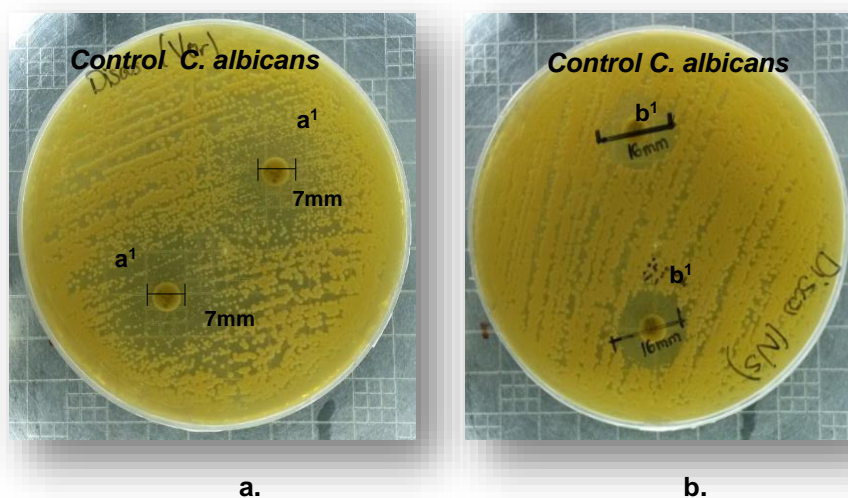
Halos de inhibición de *E. faecalis* frente a discos de sensibilidad: a<sup>1</sup> (ampicilina), a<sup>2</sup> (gentamicina), b<sup>1</sup> (amikacina).

### Diámetros de halos de inhibición (mm) de *M. luteus*



Halos de inhibición de *M. luteus* frente a discos de sensibilidad: a<sup>1</sup> (ampicilina), a<sup>2</sup> (gentamicina), b<sup>1</sup> (amikacina).

### Diámetros de halos de inhibición (mm) de *C.albicans*



Halos de inhibición de *C.albicans* frente a discos de sensibilidad: **a¹** (voriconazol), **b¹** (nistatina).

**Anexo D.** Concentración mínima inhibitoria de extractos de café y cacao.

Microorganismo	Concentración mínima inhibitoria ( CMI) (µg/mL)									
	Etanol			Agua			Etanol:Agua			Control positivo
	20°C	40°C	60°C	20 °C	40°C	60°C	20°C	40°C	60°C	
<i>Micrococcus luteus</i> , ATCC® 10240™	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>									
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,39 <sup>a</sup>
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>									
	4000	NA	NA	NA	NA	NA	4000	4000	4000	0,39 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43888™	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>									
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,39 <sup>a</sup>
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>									
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,39 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>									
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,39 <sup>a</sup>
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>									
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,39 <sup>a</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>									
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,95 <sup>b</sup>
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>									
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,95 <sup>b</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	<b>Café (<i>Coffea arábica</i>)</b>									
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25 <sup>c</sup>
	<b>Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>									
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25 <sup>c</sup>

**NA:** No activo a la dosis máxima probada (4000 µg/mL)

**Controles positivos:** (Gentamicina)<sup>a</sup>, (Tetraciclina)<sup>b</sup>, (Itraconazol)<sup>c</sup>