

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE FARMACIA

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIATURA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LA BROZA DEL COFFEA
ARÁBICA (CAFÉ) VARIEDAD CATURRA Y CATUAÍ
MEDIANTE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD
ANTIMICROBIANA IN VITRO Y SU APLICACIÓN EN
LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.**

JÉSSICA DANIELA VALVERDE GRANADOS

TUTOR: ADAM AMEY W.

SAN JOSÉ, NOVIEMBRE, 2018

Agradecimientos

A Dios por guiar cada uno de mis pasos, por darme salud y valentía en momentos de debilidad.

Gracias a él decidí confiar y creer, y por más obstáculos que se presentaran a lo largo de mi carrera, él simplemente respondió a esto con más bendiciones de las que yo me pudiera imaginar, permaneció siempre fiel en mi vida y le agradezco por amarme antes de que yo le amare a él.

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer cada día en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por cada una de sus palabras de aliento, por su paciencia y por estar dispuesta a acompañarme en largos y agotadores momentos en estos últimos cuatrimestres, a mi padre por siempre desear lo mejor para mi vida, por cada consejo y cada una de sus palabras.

A mis hermanos por el apoyo que siempre me brindaron y por nunca dejar que me diera por vencida en mis batallas, son un ejemplo para mi vida.

A Marco por darme ese ánimo para continuar el camino del que estaba cada vez más cerca de lograr, por su comprensión y valioso apoyo de inicio a fin de mi carrera.

A mis abuelitos y tía Yecala por ser un ejemplo de lucha y siempre apoyarme hasta el final.

A mi tutor de tesis Adam Amey W. por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad, así como haberme tenido toda la paciencia y orientación para guiarme durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Marco Luis Herrera especialista en bacteriología clínica por su inestimable ayuda y paciencia desde mis primeros pasos para realizar las pruebas microbiológicas en las instalaciones del Hospital Nacional de Niños. Sus aportes a esta tesis fueron de mucha importancia para esta.

A mi prima Jennifer por todo el apoyo y paciencia en este camino de tesis, sus conocimientos y su apreciable disponibilidad.

Dedicatoria

Quiero dedicar este proyecto a Dios por nunca abandonarme y siempre guiarme con valentía hacia adelante y nunca dejarme caer.

A mi familia, doy gracias a Dios por permitirme disfrutar cada momento de mi vida al lado de mis padres y hermanos, agradezco a la vida por tener una maravillosa familia. A mi madre por siempre ser ese soporte, porque sé que el camino fue un poco difícil pero hoy juntas lo estamos logrando. Hoy concluye todo el esfuerzo y dedicación que demandó la realización de esta tesis, pero el camino continúa y dentro de este camino, tengo la certeza de que mis padres y personas valiosas para mi vida querrán lo mejor para mí.

Pensamiento

“Hay días llenos de viento, hay días llenos de furia, hay días llenos de lágrimas, pero también existen días llenos de Dios, que nos dan el coraje para seguir adelante”.

Candidman

Contenido

| | |
|------------------------------------|----|
| Contenido | 5 |
| Contenido de Figuras..... | 11 |
| Contenido de Tablas | 13 |
| Contenido de Ecuaciones | 13 |
| RESUMEN | 14 |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| Planteamiento del Problema | 15 |
| Objetivos..... | 17 |
| Objetivo General | 17 |
| Objetivos específicos..... | 17 |
| Justificación..... | 18 |
| Hipótesis | 20 |
| Antecedentes..... | 20 |
| CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO..... | 26 |
| Microbiología | 26 |
| Resistencia Bacteriana..... | 28 |
| Tipos de resistencia | 28 |
| Resistencia natural..... | 28 |
| Resistencia adquirida..... | 28 |
| Resistencia cruzada. | 28 |
| Estafilococos..... | 28 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 29 |

| | |
|--|----|
| Análisis microbiológico del <i>S. aureus</i> | 30 |
| Pseudomonas..... | 30 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 31 |
| <i>Escherichia Coli</i> | 32 |
| Grupos patógenos de <i>E. coli</i> | 33 |
| Resistencia de <i>Escherichia coli</i> a los antibióticos..... | 34 |
| Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana..... | 34 |
| Patrón o Escala de Mc Farland..... | 35 |
| Medios de Cultivo en Microbiología..... | 36 |
| Tioglicolato..... | 37 |
| Agar sangre..... | 38 |
| Agar Baird- Parker..... | 39 |
| Piel..... | 40 |
| Características generales..... | 40 |
| Funciones de la piel..... | 41 |
| Protección..... | 42 |
| Contención..... | 42 |
| Regulación térmica..... | 42 |
| Sensibilidad..... | 42 |
| Flora normal de la piel..... | 42 |
| Enfermedades de la Piel..... | 43 |
| Impétigo..... | 43 |
| Celulitis..... | 44 |

| | |
|--|----|
| Foliculitis..... | 44 |
| Metabolitos Secundarios | 45 |
| Compuestos fenólicos..... | 45 |
| <i>Coffea arábica</i> | 46 |
| Clasificación taxonómica | 46 |
| Morfología del café | 47 |
| Raíces. | 47 |
| Tallo..... | 48 |
| Ramas o bandolas..... | 49 |
| Flores. | 49 |
| Fruto. | 49 |
| Semilla..... | 49 |
| Procesamiento del café | 50 |
| Proceso de la extracción de la semilla en húmedo. | 51 |
| Composición química del <i>Coffea arábica</i> | 52 |
| Ácidos grasos..... | 53 |
| Compuestos volátiles del café. | 53 |
| Compuestos fenólicos..... | 53 |
| Pirazinas. | 53 |
| Piridinas..... | 54 |
| Pirroles..... | 54 |
| Furanos. | 54 |
| Subproductos del café..... | 54 |

| | |
|--|-----------|
| Pulpa o broza del café..... | 55 |
| <i>Utilización de la broza o pulpa de café.....</i> | <i>58</i> |
| Fitofármacos | 58 |
| Uso de Plantas Medicinales..... | 58 |
| Beneficio en el uso de plantas medicinales | 60 |
| Consecuencias del uso de las plantas | 60 |
| Métodos de Extracción de Aceites Esenciales y de Extractos Vegetales..... | 61 |
| Método Soxhlet | 63 |
| Función del método Soxhlet..... | 63 |
| Etapas de extracción Soxhlet..... | 65 |
| Solventes más convenientes para utilizar el método de extracción Soxhlet. | 65 |
| Equipo por arrastre de vapor | 66 |
| Equipo Rotavapor | 67 |
| Solventes..... | 68 |
| Clasificación de los solventes..... | 68 |
| Solvente polar..... | 69 |
| Solvente no polar..... | 69 |
| Caracterización Química | 69 |
| Pruebas de identificación..... | 69 |
| Alcaloides..... | 70 |
| Saponinas y esteroides..... | 70 |
| Flavonoides..... | 70 |
| Taninos y polifenoles. | 70 |

| | |
|---|----|
| | 9 |
| Espectroscopia infrarroja..... | 70 |
| Análisis cromatografía de gases | 73 |
| Formas Farmacéuticas | 74 |
| Formas farmacéuticas semisólidas | 74 |
| Vía de administración tópica..... | 76 |
| CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO | 77 |
| Enfoque..... | 77 |
| Método..... | 77 |
| Objetos de Estudio..... | 78 |
| Instrumentos y técnicas de recolección. | 79 |
| Obtención del extracto del <i>Coffea arábica</i> | 79 |
| Material y Equipo..... | 79 |
| Reactivos. | 80 |
| Pruebas de identificación..... | 80 |
| Materiales y Equipo..... | 80 |
| Reactivos | 80 |
| Preparación de microdiluciones de la broza del <i>Coffea arábica</i> | 81 |
| Material y Equipo | 81 |
| Reactivos | 81 |
| Procedimiento de recolección y análisis de datos | 82 |
| Recolección y almacenamiento de la materia prima vegetal..... | 82 |
| Obtención del extracto de la broza del café..... | 82 |
| Extracción Soxhlet..... | 82 |

| | |
|---|-----|
| Extracción arrastre por vapor. | 85 |
| Caracterización y cuantificación de los componentes de la broza del <i>Coffea arábica</i> .. | 87 |
| Identificación de Fenoles..... | 88 |
| Preparación para la prueba de sensibilidad antimicrobiana mediante microtitulación. . | 89 |
| Determinación de la propiedad bactericida de la broza del café | 94 |
| Elaboración de la crema antimicrobiana | 95 |
| CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS | 97 |
| Obtención del extracto de la broza del café..... | 97 |
| Caracterización y cuantificación de los compuestos de la broza del <i>Coffea arábica</i> a través de pruebas de identificación | 104 |
| Caracterización Espectroscópica mediante Cromatografía de Gases Acoplado a Masas del Extracto de <i>Coffea Arábica</i> Extraído con el Equipo Soxhlet..... | 109 |
| Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana Mediante Microtitulación del extracto de la broza de <i>Coffea arábica</i> (café)..... | 114 |
| Interpretación de la prueba de sensibilidad antimicrobiana por microtitulación para el método Soxhlet..... | 119 |
| Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en la prueba de Microtitulación | 123 |
| Determinación de la propiedad bactericida del extracto de la broza del café | 125 |
| Elaboración de una crema a base del extracto de la broza de <i>Coffea arábica</i> | 126 |
| Determinación de la eficacia de la crema (fitofármaco), extracto de la broza del <i>Coffea arábica</i> (café) de manera experimental mediante una PSA por microtitulación | 130 |
| Interpretación de la prueba de sensibilidad antimicrobiana por microtitulación para crema a base de <i>Coffea arábica</i> (café)..... | 131 |
| CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 133 |
| Conclusiones..... | 133 |

| | |
|-----------------------|-----|
| Recomendaciones | 135 |
|-----------------------|-----|

| | |
|-------------------|-----|
| REFERENCIAS | 136 |
|-------------------|-----|

Contenido de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Científico Antony Van Leeuwenhoek | 27 |
| Figura 2. Observación Microscópica <i>S. aureus</i> | 29 |
| Figura 3. Observación Microscópica <i>P. Aeruginosa</i> | 31 |
| Figura 4. Observación Microscópica de <i>E. coli</i> | 33 |
| Figura 5. Composición de la Turbidez Estándar de McFarland..... | 36 |
| Figura 6. Cultivo de <i>S. Aureus</i> en Agar Sangre | 39 |
| Figura 7. Cultivo de <i>S. Aureus</i> en Agar Sangre | 40 |
| Figura 8. La Piel y Sus Estructuras Especializadas..... | 41 |
| Figura 9. Impétigo Estafilocócico: Forma Neonatal | 44 |
| Figura 10. Morfología de la Parte Superior del Café | 48 |
| Figura 11. Estructura del Fruto de Café | 50 |
| Figura 12. Subproducto del Café..... | 55 |
| Figura 13. Pulpa o Broza del Café | 56 |
| Figura 14. Métodos Directos de Extracción..... | 61 |
| Figura 15. Método de Extracción a través de la Destilación..... | 62 |
| Figura 16. Método de Extracción a través de Solventes Orgánicos..... | 62 |
| Figura 17. Equipo Soxhlet..... | 64 |
| Figura 18. Equipo Arrastre por Vapor | 67 |
| Figura 19. Equipo Rotavapor Yamato..... | 68 |
| Figura 20. Diagrama de un Cromatógrafo de Gases | 73 |
| Figura 21. Equipo Soxhlet..... | 83 |
| Figura 22. Peso de la Broza del Café | 83 |
| Figura 23. Equipo Rotavapor Yamato BM500 | 85 |
| Figura 24. Equipo Arrastre por Vapor | 86 |
| Figura 25. Eliminación de Agua a la Broza del Café..... | 87 |
| Figura 26. Reactivos para la Prueba de Identificación..... | 88 |
| Figura 27. Placa Estéril para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana (PSA)..... | 89 |
| Figura 28. Diluciones Dobles del Extracto | 91 |
| Figura 29. Inóculo Bacteriano Estandarizado en Medio McFarland | 92 |
| Figura 30. Incubación Bajo Condiciones Adecuadas por 24 horas..... | 92 |
| Figura 31. Control Positivo y Negativo (11-12) | 93 |
| Figura 32. Interpretación a través del Lector con Espejo..... | 94 |
| Figura 33. Broza de <i>Coffea arábica</i> Triturado para las Extracciones | 98 |

| | |
|---|-----|
| Figura 34. Extractos de Broza de Café Obtenidos con el Equipo Soxhlet utilizando etanol al 96% | 100 |
| Figura 35. Obtención del Extracto de Broza de <i>Coffea arábica</i> por el Método Arrastre por Vapor | 102 |
| Figura 36. Obtención del Extracto de Broza de <i>Coffea arábica</i> por el Método Arrastre por Vapor | 103 |
| Figura 37. Resultados de la Prueba de Acetato de Plomo al 10 % | 105 |
| Figura 38. Prueba del Blanco con Etanol y Acetato de Plomo al 10 % | 106 |
| Figura 39. Reacción de Tanino con Acetato de Plomo (II)..... | 106 |
| Figura 40. Resultados de la Prueba Gelatina- Sal | 107 |
| Figura 41. Prueba del Blanco con Etanol y Gelatina y Sal | 107 |
| Figura 42. Resultados de la Prueba de Cloruro Férrico al 10% | 108 |
| Figura 43. Prueba del Blanco con Etanol y Cloruro Férrico al 10 % | 108 |
| Figura 44. Reacción de Tanino con Cloruro Férrico..... | 109 |
| Figura 45. Caracterización Espectroscópica Mediante Cromatografía de Gases Acoplado a Masas del Extracto de <i>Coffea arábica</i> Extraído en Equipo Soxhlet..... | 110 |
| Figura 46. Espectro Infrarrojo del Extracto de <i>Coffea arábica</i> Extraído Mediante el Equipo Soxhlet | 112 |
| Figura 47. Espectro Infrarrojo del Extracto de Coffe Arábica Extraído Mediante el Equipo Arrastre por Vapor | 113 |
| Figura 48. Cepas Bacterianas en Agar Sangre Obtenidas en el Hospital Nacional de Niños..... | 115 |
| Figura 49. Colocación del Extracto Puro a la Placa de Microtitulación | 117 |
| Figura 50. Preparación del Inóculo Bacteriano por el Patrón McFarland..... | 118 |
| Figura 51. Observación de la Turbidez Tomando como Referencia el Control Positivo (Pozo 11), Extracto Obtenido a través de Método Soxhlet | 120 |
| Figura 52. Interpretación de Resultados a través de un Espejo Lector | 121 |
| Figura 53. Observación de la Turbidez Tomando como Referencia el Control Positivo (pozo 11), Arrastre por Vapor | 122 |
| Figura 54. Turbidez de los Pozos para Hallar la CMI..... | 123 |
| Figura 55. Observación de la Propiedad Bactericida del Extracto de la Broza del Café Frente a Cepas Bacterianas | 125 |
| Figura 56. Apariencia de la Crema a Base del Extracto de Broza de <i>Coffea arábica</i> | 128 |
| Figura 57. Envase Primario de la Crema..... | 129 |
| Figura 58. Envase Secundario de la Crema..... | 130 |
| Figura 59. Observación de la PSA para la Crema a Base de extracto de <i>Coffea arábica</i> (Café) . | 132 |

Contenido de Tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Aspectos Fisicoquímicos del Caldo Tioglicolato..... | 37 |
| Tabla 2. Clasificación Taxonómica del <i>Coffea arábica</i> | 47 |
| Tabla 3. Composición Química del Café | 52 |
| Tabla 4. Composición Física de la Broza del Café | 56 |
| Tabla 5. Composición Química del Extracto de Café Arábico | 57 |
| Tabla 6. Componentes Orgánicos Presentes en la Broza del Café..... | 57 |
| Tabla 7. Formas Más Comunes de Uso de las Plantas con Propiedades Medicinales..... | 59 |
| Tabla 8. Puntos de Ebullición de los Solventes Utilizados con Mayor Frecuencia en el Método Soxhlet | 66 |
| Tabla 9. Frecuencia Cercana a la que se Encuentran Grupos Funcionales en un Espectro Infrarrojo | 72 |
| Tabla 10. Tipos de Formas Farmacéuticas Semisólidas | 75 |
| Tabla 11. Diluciones a partir del extracto de la broza del café | 90 |
| Tabla 12. Formulación de la crema..... | 95 |
| Tabla 13. Porcentajes de Extracción Resultantes de las Dos Técnicas Evaluadas en la Obtención del Extracto (<i>Coffea arábica</i>) | 99 |
| Tabla 14. Características Organolépticas del Extracto Obtenido..... | 101 |
| Tabla 16. Características Organolépticas del Extracto Obtenido..... | 104 |
| Tabla 15. Resultados de las Pruebas de Caracterización del Extracto de <i>Coffea arábica</i> Obtenido por el Método Soxhlet..... | 105 |
| Tabla 17. Resultados Obtenidos mediante el Análisis de CG- MS a través de un Detector de Masas | 111 |
| Tabla 18. Asignación de Grupos Funcionales al Espectro Infrarrojo del Extracto de Broza de <i>Coffea arábica</i> Obtenido mediante el Equipo Soxhlet..... | 113 |
| Tabla 20. Diluciones a partir del Extracto de la Broza del Café..... | 117 |
| Tabla 21. Resultado Obtenido de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por Microtitulación | 124 |
| Tabla 22. Resultado Obtenido de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) por Microtitulación | 126 |
| Tabla 23. Porcentajes de los Reactivos Utilizados para la Elaboración de la Crema. | 127 |
| Tabla 24. Características de la Crema elaborada. | 127 |

Contenido de Ecuaciones

| | |
|---|-----|
| Ecuación 1. Rendimiento Experimental en el Método Soxhlet | 84 |
| Ecuación 2. Rendimiento Experimental de Método Arrastre por Vapor. | 87 |
| Ecuación 3. Rendimiento Obtenido en el Método Soxhlet. | 101 |
| Ecuación 4. Rendimiento Obtenido del Método Arrastre por Vapor..... | 103 |

RESUMEN

El presente trabajo de investigación trata sobre la “Determinación de la actividad antimicrobiana de la broza del *Coffea arábica* (café) variedad caturra y catuaí mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana in vitro y su aplicación en la industria farmacéutica”. El objetivo de esta investigación es evaluar la actividad antimicrobiana de la broza del *Coffea arábica* (café) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismos que reportan ser de mayor virulencia y gran resistencia a los antibióticos, en lo que respecta a la población costarricense.

Por medio de este estudio, se logra alcanzar una trascendencia ambiental, medicinal y cultural; considerando que la utilización de este potencial natural, resulta ser favorable por las propiedades antimicrobianas que presenta el extracto. Por lo tanto, este proyecto resolvió y pretende seguir resolviendo las problemáticas relacionadas con el impacto negativo en el ambiente, que el residuo de la broza de café presenta, además, de reducir las emisiones de gases del efecto invernadero que produce el manejo tradicional de la broza.

La investigación llevó a cabo la extracción y purificación del extracto de la broza de *Coffea arábica* mediante dos métodos de extracción, con el fin de determinar cuál método adquiriría un mejor rendimiento. Se realizaron, además, pruebas de caracterización química para la determinación de metabolitos activos presentes en el extracto, principalmente, la presencia de taninos, específicamente los polifenoles, los cuales, de acuerdo con investigaciones anteriores se ha determinado que estos presentan una actividad antimicrobiana.

Para la determinación de la capacidad antimicrobiana se empleó la prueba de sensibilidad antimicrobiana (PSA), a través de una placa de microtitulación, también se utilizó medio de cultivo tioglicolato, inóculos bacterianos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y extracto puro de broza de café. Esta prueba dio como resultado la capacidad del extracto de la broza de *Coffea arábica* de inhibir microorganismos.

Los datos obtenidos en este estudio indican que la caracterización química por medio de pruebas de química-líquida y espectroscópicas detectaron la presencia del grupo funcional

correspondiente a los fenoles, lo cual potencializa su propiedad antimicrobiana capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Palabras clave: *Coffea arábica*, Soxhlet, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, PSA.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Planteamiento del Problema

En el presente trabajo de investigación se aborda el estudio de la composición química y la actividad antimicrobiana que presentan los activos de la especie *Coffea arábica* (café). Tomando en cuenta que la plantación del café es común en Costa Rica, es de interés que la pulpa o broza de café sea un subproducto útil para estudiarlo, esto con el fin de dar a conocer su caracterización y valoración, así como lo necesario para determinar su actividad farmacológica y como consecuencia, sus principales aplicaciones en la industria farmacéutica.

El uso de plantas medicinales en Costa Rica proviene de tres grupos humanos: el grupo indígena, caucásico y el afro costarricense, que a través del tiempo han conformado una variada medicina tradicional. En el país se usan aproximadamente 500 plantas medicinales provenientes de diferentes regiones, de acuerdo con lo citado por Giraldo et al. (2015). Dicho autor hace énfasis en el uso tradicional de plantas, al indicar que este ha logrado ser beneficioso y ampliamente reconocido en los mercados populares (p.74).

La pulpa o como bien es conocido en Costa Rica la broza del café abarca aproximadamente el 50 % de la fruta. Esta es muy particular y contiene una serie de compuestos que la hacen difícil de degradar, como bien es sabido esta se desecha, siendo actualmente la causante de un gran problema, pues entre más grande es la escala de su procesamiento, mayor impacto ambiental presenta, ya que la pulpa posee alrededor de un 80 % de humedad, así como de una cantidad importante de azúcares. Esta combinación es la causante de la generación de malos olores, atracción de moscas u otros insectos que afectan a las comunidades y al ambiente en los lugares de mayor producción de café.

En lo que respecta a la resistencia microbiana de enfermedades o virus, esta ha aumentado en todos los países, y representa en la actualidad uno de los principales problemas de salud, que afecta no solo al entorno hospitalario, sino también al resto del sistema sanitario de cada región. Por esto es considerada como un peligro ante enfermedades infecciosas, las cuales han pasado a una categoría principal de muerte (Martínez, 2016, p.8).

Según la Organización Mundial de la Salud (2018), el aumento de resistencia a antibióticos es un tema de preocupación, tanto a nivel nacional como internacional, el cual provoca una mayor prolongación de las infecciones que permiten la transmisión de los microorganismos, tanto del paciente infectado como a los que lo rodean. Posterior a estos procedimientos, es fundamental el tratamiento con antibioticoterapia para evitar infecciones intrahospitalarias en este tipo de pacientes.

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) tiene actualmente aprobados un grupo muy pequeño de fármacos, entre los que se encuentran antibióticos que son producidos a partir de material vegetal. Esta institución destaca que existen medicamentos a nivel natural ya documentados con múltiples beneficios que se presentan en este fitoquímico y la actividad de estos extractos con hierbas que tienen una capacidad antibiótica conocida. El autor concluye que los productos naturales son fuente para innovar, y de esta manera encontrar nuevas moléculas importantes de estudio. El uso de técnicas relacionadas como: el aislamiento, la identificación, la extracción y la comercialización provocaría que los productos sean más económicos, eficaces y rápidos en fabricación. (Manhood, 2013, pp. 825-830)

Según Ávalos (2015), aproximadamente 5000 bacterias infectan a la población en un año, sin embargo, de las 20 bacterias más prevalentes en Costa Rica, el *Staphylococcus aureus* es el segundo microorganismo más patógeno, con 630 casos reportados de población infectada de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), siendo uno de los principales temas en centros médicos del país. Esto ha generado un importante impacto y cada vez son más las cepas que crean resistencia al tratamiento estándar de la CCSS, provocando tomar medidas más rigurosas (párr.2-7).

La tesis aportará un resultado farmacológico que permitirá favorecer a las personas infectadas con el tratamiento de fitoterapia de forma segura y efectiva, de manera tal, que se dé el aprovechamiento de los recursos naturales, lo cual es un beneficio dado que actualmente se buscan

nuevas alternativas para el tratamiento de las enfermedades y cada vez más se crea una tendencia de optar por lo natural debido a la menor exposición de efectos secundarios, entre otras ventajas que los medicamentos naturales proporcionan.

En este trabajo se tratará de, dar respuestas a las interrogantes anteriores y a partir de lo mencionado se visualiza el propósito planteado de la investigación, formulando la siguiente pregunta:

¿Es posible determinar la actividad antimicrobiana de la broza del *Coffea arábica* (café) en la variedad Caturra y Catuaí de Costa Rica frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*?

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana de la broza del *Coffea arábica* (café) variedad Caturra y Catuaí de Costa Rica frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivos específicos

Determinar el método de extracción que brinde la mayor conveniencia en la obtención del extracto de la broza del café.

Evidenciar la presencia de los principales componentes reportados, de la broza del café, mediante pruebas de química-líquida y espectroscópicas.

Evaluar la capacidad antimicrobiana del extracto de la broza del café sobre el *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* mediante la prueba sensibilidad antimicrobiana.

Elaborar una crema a base del extracto de la broza del café con propiedades antimicrobianas.

Justificación

La importancia de la investigación radica en la especie en estudio, debido a su familiarización a nivel nacional, así mismo, que se ha logrado reconocer que el consumo de café es muy elevado en la población costarricense, por lo que, los microbeneficios que elaboran este producto, se ven en la necesidad de procesar cada día más cantidad de esta planta, lo cual genera una mayor cantidad de producto presente sin utilidad alguna.

A pesar de que la pulpa del café ha presentado y sigue presentando problemas de contaminación ambiental, que se agudiza conforme se producen y procesan mayores cantidades de café, en los beneficios centralizados, las políticas de control de contaminación ambiental han jugado un papel insignificante en la promoción de investigaciones para encontrarle un uso a este subproducto.

Las infecciones causadas por microorganismos establecen un aumento y una importante diseminación de la resistencia a los antimicrobianos, llegando a ser de difícil manejo e incluso no llegar a responder al tratamiento antimicrobiano. Estas infecciones provocadas por un agente causal deben ser tratadas de manera eficaz y segura.

El desarrollo en la medicina natural antigua para mantener la salud es trascendental, puesto que cada planta presenta su propio mecanismo para ser utilizado, lo cual hace que se mantenga un equilibrio ecológico. Sin embargo, el ser humano a lo largo de los años le ha dado un aprovechamiento con el fin de combatir enfermedades y epidemias que radican en el entorno y que, en terapias no convencionales, muchísimos productos químicos pueden actuar de manera peligrosa sobre el organismo (Rodríguez, Medina, Cabrera y Díaz, 2002, p.139).

El impacto que se presenta en la salud pública frente a los perfiles de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se describe a través de una publicación, la cual indica, que estas bacterias presentan una serie de sintomatologías que comprometen al afectado con síntomas que se van desde una intoxicación hasta la muerte. Destacándose también, que esas intoxicaciones se derivan del uso excesivo de antibióticos, y que parte de los alimentos que se consumen hoy en día en la vida cotidiana del costarricense, están correspondiendo como reservorio

para poder llegar a almacenar la resistencia a determinados antibióticos (Alvarado, Mora, Arias, Rojas y Chaves, 2011, p.103).

Orientado a la calidad de vida de los pacientes, la fitoterapia es uno de los métodos innovadores de tratamiento que eligen las personas hoy en día. El conjunto de resultados del presente estudio servirá como herramienta para futuros investigadores, de modo que puedan contar con información de utilidad para la elaboración de tratamientos efectivos mediante la fitoquímica, los cuales son aceptables para las infecciones que son causadas por microorganismos. La investigación no solo favorece a la comunidad farmacéutica, sino también que colabora con el desarrollo de medicamentos para los pacientes que son víctimas de las infecciones por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Al llevar a cabo la extracción de la broza *Coffea arábica* (café) en su variedad Caturra y Catuaí de Costa Rica, un material que es considerado como desecho, y que ha sido facilitado por el Microbeneficio de COOPEDOTA, Santa María de Dota, Costa Rica. A partir de este material se pueden obtener diferentes componentes de la planta. Este material contiene propiedades favorables y que se pueden emplear de otras formas de igual o mayor importancia, no solo desde el enfoque que se dará en esta investigación, sino también a partir de futuros investigadores que a través de ensayos logren demostrar diversas propiedades, tales como antioxidante, fuente de energía y abono orgánico en el campo agrícola y ganadero.

Por otro lado, desde el punto de vista ambiental, es ideal que se pueda dar utilidad a la broza del café. Y así tratar el desecho de forma positiva a una escala mayor, pues bien, para este fin se puede lograr una degradación de la materia “comestible”, azúcares y demás compuestos simples a cargo de microorganismos, ya sean que se encuentren presentes o sean agregados a la broza.

Lizano (2013) enfatiza que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales o extractos que aparecen en los alimentos es de interés como alternativa natural, ya que se adquieren para inhibir el deterioro de agentes patógenos. Este autor por otro lado ha destacado que el reemplazar preservantes sintéticos en los aceites esenciales extraídos de plantas como albahaca, rábano, clavo de olor, ajo y tomillo han sido de ayuda necesaria, efectiva y segura para la población en general. (pp. 15-16).

A través de los años es importante tener presente nuevos principios activos, mediante materia vegetal que pueda ser extraída por algún método, y con capacidad antimicrobiana, con el fin de llegar a reducir la resistencia a los antibióticos ya formulados, que han sido muy utilizados en infecciones tanto intrahospitalarios como en el ambiente.

Los resultados que se tendrán en esta investigación pueden aportar de manera positiva con la disponibilidad en la utilización de productos naturales que se encuentran a nuestro alcance en Costa Rica, siempre buscando una mayor eficacia en el tratamiento de enfermedades frente a agentes patógenos provocados por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, ya que estos son los microorganismos de más prevalencia en el país.

De acuerdo con lo antes mencionado, se podrían fabricar, eventualmente antibióticos que contengan el extracto de broza del café, mediante un completo proceso que permita el tratamiento de infecciones y enfermedades a un bajo costo, de buena calidad y de manera efectiva.

Hipótesis

El extracto de la broza del café tiene eficacia como antibiótico contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Antecedentes

En la recolección de los antecedentes nacionales e internacionales relacionados con esta investigación se utilizaron una serie de estudios obtenidos en las bases de datos BINASS, CATIE, Pubmed, EBSCO, BioMed, Medline, así como a nivel nacional se encontraron artículos científicos, tesis y estudios clínicos en revistas científicas electrónicas de instituciones universitarias como la Universidad de Costa Rica (UCR), la Universidad Iberoamérica (UNIBE) y la Universidad Internacional de las Américas (UIA).

Después de la búsqueda de información se lograron identificar antecedentes, tanto a nivel internacional como nacional, los cuales se describirán a continuación.

El estudio realizado por Gotteland y de Pablo (2007) en Chile, acerca de la relación entre el consumo del café y la salud. El artículo nombrado “Algunas verdades sobre el café” dando a conocer el origen del café, este cultivo apareció por primera vez en Etiopía, en la provincia de

Keffa, de cuyo nombre se deriva el café en África Oriental, donde fue introducido en otros lugares como Yemen, Arabia y Egipto. Más tarde fue trasladado a Europa por medio de Italia, sin embargo, la llegada de este cultivo a América se dio a través de los franceses (p.229).

El cultivo del café fue plantado en jardines botánicos en Ámsterdam, París y Londres, tiempo después se desarrolló en América a comienzos del siglo XIX. Esta planta es una especie autoalógama, lo cual implica que sus primeras plantaciones se fecundan y sus segundas presentan una fecundación entrecruzada para su producción siguiente, es decir, que para las que se auto fecundan la misma flor es fecundada sin intervención de agentes polinizantes externos, mientras que para la entrecruzada intervienen diversos agentes polinizadores como viento, agua, insectos (López, 2012, pp. 11-12).

La Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (2010), indica que, el sistema radicular del *Coffea arábica* (café) es el encargado en un 85- 90 % de la absorción de nutrientes y de agua para la planta. Esta afirmación de la federación es trascendental para poder entender la contribución que aporta esta planta para el soporte de sus raíces, así como desarrollar un mejor campo agrícola de manera que pueda generar abundantes beneficios (p.16).

En el mundo el café tiene un significativo valor comercial, en especial las especies de café arábigo (*Coffea arábica*) y el café robusta (*Coffea cachiporra*), pues son de mayor producción a nivel mundial. Destacándose otras variedades no tan trascendentales como los liberianos, excelsos y otras subespecies descendientes de estas (Raiza, 2011, p.22).

La variedad arábica representa el 75 % de la producción mundial del café. Los granos de este producto tienen una forma aplastada y alargada, es ovalada y presenta una raya divisoria en forma de “S”. Esta variedad adquiere cualidades que le generan una bebida aromática, de un mejor sabor y calidad. Además, es importante destacar que los autores describen que el porcentaje de cafeína de esta variedad, en comparación con el robusta, es la mitad de la variedad arábica. La producción de café arábica se da desde marzo hasta octubre (Raiza, 2011, p.22).

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria que, fue descubierta por Alexander Ogston en 1880, la cual ha tenido un importante interés microbiológico, pues es la causante principal de infecciones bacterianas a nivel mundial, lo que conlleva a caracterizarla como patógena y virulenta, tanto como para el ser humano como para los animales (Cervantes, García y Salazar, 2014, p.25).

El problema que presentó esta cepa bacteriana en los años 60, tal como lo refiere el mismo autor, fue haber creído que ya existía un tratamiento en específico de infecciones causadas por *S. Aureus*, el cual se relacionó con la penicilina semisintética o meticilina, y tiempo después presentó la habilidad de producir resistencia a este antibiótico, dando lugar a un alto riesgo de mortalidad (p.26).

La *Pseudomonas aeruginosa* fue encontrada mediante un cultivo puro de heridas cutáneas en 1882, esto por Gessard. Esta bacteria presenta importantes factores de virulencia, y un amplio campo en infecciones, así como múltiples mecanismos de resistencia para el ser humano (Luján, 2014, p.2).

Por otro lado, *Escherichia coli*, es un agente patógeno que fue encontrado a través de la materia fecal y aislada en un niño en 1885 por el alemán bacteriólogo Theodor Von Escherich. Actualmente, esta bacteria presenta un hábitat gastrointestinal en los seres humanos y animales, y otros agentes causantes de infectar a otros lugares del cuerpo humano, esto según Salas (2014, p.65).

A nivel internacional se lograron identificar los siguientes antecedentes:

La tesis de Días realizada en el 2011 en Ecuador, titulada “Pulpa de café: *Coffea arábica* L: Como fuente alternativa de antioxidantes” de la Universidad Católica, se fundamenta en determinar cuál es el mejor solvente para extraer los compuestos antioxidantes en la pulpa fresca del café, además de sacar un mayor beneficio a la utilización de dicho residuo. Lo anterior fue provechoso, ya que se exponen parámetros que dan pie al empleo de dicha broza o pulpa del café, reflejando un aprovechamiento útil, el que se dará a conocer en esta investigación. El ensilaje de la pulpa de café es una alternativa válida para poder utilizar y almacenar las cantidades mayores de café que se producen en el fruto del café, por lo que es uno de los productos que presentan una variedad de alternativas para ser recicladas en su totalidad (p.31).

El café es uno de los productos agrícolas más cultivados a nivel mundial, por lo que se han extendido sus diversas variedades, así como su utilidad en múltiples campos de desarrollo.

El artículo científico “Actividad antibacteriana de té y café: sus extractos y preparaciones” realizado por Singh, Jeet y Kau en el 2009, en la India, expone alguna teoría de cómo se experimenta el efecto antibacteriano a bajas concentraciones de extractos de café y de té contra

agentes patógenos como lo son las bacterias. Esto se dio mediante la preparación de un inóculo, se tomó en cuenta la sensibilidad a la bacteria y la comparación frente antibióticos. Se dio como resultado que, frente a las seis cepas estudiadas, la *P. Aeruginosa* resultó resistente a la Ampicilina y al Cotrimoxazol, siendo inhibida por el té y el café. Concluyeron que estas plantas, además de presentar agentes antimicrobianas, su uso se hace posible como agente ante infecciones nosocomiales (p.289).

Sotelo, Casas y Camelo en el 2010 en Colombia titularon su investigación como “Borojó (*Borojoa patinoi*): Fuente de Polifenoles con actividad Antimicrobiana”, donde establecen la importancia de las propiedades antioxidantes, ricas en compuestos fenólicos. En esta investigación se logró obtener un halo de inhibición importante de los extractos acuosos de polifenoles en comparación con diferentes medios como agua, fenol, ácido gálico y ácido láctico frente a *S. aureus* y *E. coli* (p.331). Concluyeron que, mediante la actividad microbiana para estas cepas, según resultados de halos de inhibición positiva son de 8 mm, por tanto, se llegó a establecer que, a mayor halo de inhibición, mayor contenido de polifenoles y efecto antimicrobiano de los extractos (p.334).

En el 2013, Puertas, Villegas y Rojano, en Colombia, realizaron un estudio sobre la recuperación de compuestos fenólicos a partir de la borra (broza) de café. El artículo nombrado “Borra de café colombiano (*Coffea arábica*) como fuente potencial de sustancias con capacidad antirradicales libres in vitro” muestra como recuperaron compuestos fenólicos para poder aportarle un valor agregado a un residuo de origen vegetal como fuente de componentes con capacidad antirradicales libres in vitro, concluyendo que todos los extractos mostraron una capacidad antioxidante, con extracto de etanol y agua.

Los mismos autores lograron identificar los avisos clorogénicos e isoclorogénicos, como principales compuestos de la borra del café (p. 472).

Por otro lado, destacaron a la borra del café como el subproducto de residuo en el grano tostado que se obtiene durante el proceso de molienda, donde destaca un alto contenido significativo de compuestos polifenoles. Esto conlleva a que puedan ser usados como material de inicio para el desarrollo de nuevos productos.

El artículo científico “Capacidad Antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de Santander (Colombia)”, realizado por Fonseca, Calderón y Rivera en el 2014, en Colombia, explica la capacidad antioxidante y la determinación del contenido en fenoles en la producción del café. Dichos autores enfatizan que este país es la cuna de la producción del café, donde a lo largo de los años han logrado desarrollar investigaciones en estudios relacionados, pero no en cuanto a capacidad de fenoles totales en producción de café y en su comercialización (p.230).

Los autores revelan que, además de obtener un número de fenoles en estos productos y subproductos, han encontrado un amplio potencial de los residuos del café como fuente natural para otros empleos alternativos, como fuente de energía renovable, fertilizantes en agricultura, sustitutos en los concentrados para ganado lechero, lo cual representa un alto impacto ambiental con características positivas, ya que hay un ahorro del 30 % en lo que respecta al costo de la alimentación del ganado lechero. Concluyeron que de las muestras utilizadas para este estudio tanto comerciales como sin tostar, todas presentaron capacidad antioxidante y compuestos fenoles en su totalidad (pp. 234).

El estudio realizado por Duangjaia, Suphromb, Wungrathc, Ontawonga, Nuengchamnongd y Yosboonruange (2016) en Tailandia mostró la actividad antimicrobiana de la pulpa de café frente a bacterias Gram positivo y Gram negativo como la *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Este proyecto fue llamado “Comparación de las actividades Antioxidantes, antimicrobianas y perfiles químicos de tres extractos acuosos de pulpa de café (*Coffea arabica*)”, en el cual analizaron las propiedades antibacterianas mediante agar de Müller Hilton (MHB) y la determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima. Dando como resultado que la concentración de CPE₁ (Extracto de pulpa de café en la muestra número 1), inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas en menor grado que la concentración que inhibió las bacterias Gram negativas (p.328).

A nivel nacional se llegaron a destacar los siguientes:

Dentro de las investigaciones que han logrado desarrollarse en cuanto a la actividad antimicrobiana de la broza del café, han sido nulas en aspectos clínicos; sin embargo, Costa Rica es un país esencialmente agrícola, en el que predomina el cultivo del café desde hace muchos años.

Según el Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE), uno de los primeros países a nivel de Centroamericano que estableció el cultivo del café para su producción fue Costa Rica. Asimismo, personas prestigiosas ayudaron con el desarrollo de este cultivo y se asignó al padre Feliz Velarde como el primer sembrador. Según este instituto, conforme crecían las primeras plantas de este cultivo se incrementaba el interés del país, fue así para 1821 la producción del café contaba con 17 mil cafetos, esto conduce al país una apertura económica y social destacada.

En Costa Rica, la tesis de Rosales y Rodríguez (2018), “La utilización de pectinas del café (biomasa) para generar geles de usos cosmético” se basó en la utilización de la cantidad de materia orgánica del café, que abarca el residuo generado por consumos agrícolas de todo tipo. Con el objetivo de utilizar estos desechos para generar geles de formulación cosmética para esto se realizó una extracción de pectinas a partir de la capa externa del café donde se encuentra el mucilago, se llegó a la conclusión de que se originó un gel entrecruzado de las moléculas de acuerdo con la interpretación de análisis espectroscópicos y cromatográficos (pp.12-61).

En el trabajo de investigación “Evaluación de la producción de Biogás por medio de la biodigestión anaerobia semicontinua utilizando residuos del beneficiado del café como sustrato”, realizado por Rojas en la Universidad de Costa Rica en el 2015 se estudió el manejo de desechos del café; sin embargo, ellos mencionan que el 27 de agosto de 1992, se firmó un acuerdo con varias instituciones internacionales entre ellas ICAFFE, Instituto costarricense de electricidad (ICE), Ministerio de Salud (MINSAL) y Acueductos y Alcantarillados (AyA), con el fin de implementar un sistema de tratamiento para los residuos sólidos y agua de lavados del procesamiento del café (p.26)

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

En el presente capítulo se facilitará al lector una idea más clara acerca del tema a estudiar, basado en la microbiología a partir de la sensibilidad presentada en antimicrobianos y en la composición fitoquímica de los componentes de la broza del *Coffea arábica* (café), variedad Caturra y Catuaí en Costa Rica, para su aplicación en la industria farmacéutica. Se encontrarán conceptos básicos, complementarios y específicos al tema a desarrollar. Así mismo, se explicarán fundamentos sobre las técnicas y métodos que permiten llevar a cabo la extracción, e identificación de los compuestos de la variedad de broza a estudiar.

Microbiología

La microbiología se define como el estudio de los microorganismos pertenecientes a un grupo amplio que viven en forma de células aisladas o en grupos. Los microorganismos tienen un fuerte impacto en el ambiente, en su composición química y física, así como los ciclos de carbono, nitrógeno, azufre y oxígeno (Brooks, Carroll, Butel, Morse y Mietzner, 2011, p.1).

Mucho antes de que se descubriera el mundo microbiano, el hombre ya había distinguido la existencia de los microorganismos, debido a una continua interacción con ellos. Antony Van Leeuwenhoek, fue el primer observador y descriptor científico de microorganismos, además de contruir microscopios sencillos a base de lentes de vidrio biconvexos, colocando placas de plata. Sus microscopios llegaron a aumentar de 50 a 300 veces de tamaño, iluminándose con muestras líquidas y colocándo en piezas de vidrio, lo que permitió la observación de las bacterias (Lansing, 2004).

En 1875 y 1910, fue un periodo muy importante para la microbiología, ya que se conceptualizaron muchas enfermedades bacterianas, así como los microorganismos causantes de cada enfermedad (Ryan, 2011, p.3).

Figura 1. Científico Antony Van Leeuwenhoek



Nota: Collard (1985)

Los microorganismos se sitúan en todas partes, en el aire que se respira, en el suelo, en las aguas naturales, océanos, lagos, ríos y en los alimentos de consumo diario. No obstante, solo una pequeña parte de los microorganismos que han desarrollado habilidades de adaptación para sobrevivir dentro del organismo generan perjuicio o algún tipo de enfermedad. Tales microorganismos se denominan agentes infecciosos o patógenos, la generalidad de los agentes infecciosos que afectan al ser humano son bacterias, hongos y virus, siendo estos portadores de enfermedades (p.2).

Resistencia Bacteriana

Tipos de resistencia

A continuación, se describirán los tipos de resistencia bacteriana que existen, según Pérez y Robles (2013):

Resistencia natural.

Esta resistencia es aquella que es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, por lo que permite tener ciertas ventajas respecto otras cepas que pueden sobrevivir en caso de que se utilice otro antibiótico (p.188).

Resistencia adquirida.

Es aquel tipo de resistencia en el que, las bacterias tienen una especialidad propia y que por naturaleza son sensibles a algún antibiótico que ha sido modificado genéticamente, ya sea por mutación o por la adquisición de genes de resistencia (p.188).

Resistencia cruzada.

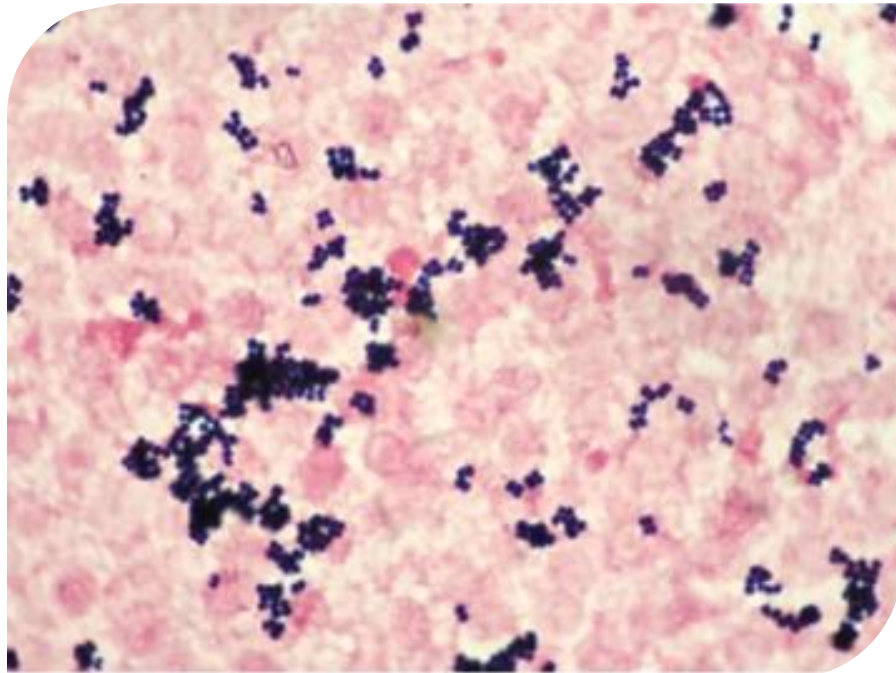
Esta se manifiesta frente a diferentes antimicrobianos que tienen un mismo mecanismo de acción, lo cual puede llegar a limitarse si se establece un diagnóstico etiológico correcto o si se administran dosis adecuadas durante un tiempo indicado (p.188).

Estafilococos

Según Brooks et al. (2011), los estafilococos son células de morfología esférica dispuestas en conjuntos irregulares, poseen una propiedad metabólica, estos fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían de acuerdo a su color. Se dice que estos pueden causar hemólisis, coagular el plasma y producir diferentes enzimas y toxinas extracelulares (p.199).

Cervantes, García y Salazar (2014), hablan sobre este agente que es compuesto por 35 especies y 17 subespecies, entre ellas cabe destacar la importancia de patógenos de este grupo como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus saprophyticus* (p.101).

Figura 2. Observación Microscópica *S. aureus*



Nota: Pahissa (2009)

A nivel mundial, especies de estafilococos son comunes en la flora cutánea, pero las enfermedades causantes por este son de baja intensidad, por lo que se somete a una intervención mecánica en el hospedador, como la implantación de un catéter permanente.

Staphylococcus aureus

S. aureus pertenece al grupo de los estafilococos Gram positivos, siendo estos los agentes patógenos más comunes en causas de infecciones de la piel y en ciertos casos de neumonía, endocarditis y osteomielitis, también se le atribuye su capacidad de producir metástasis a distintos órganos del ser humano como en pulmón, riñón, huesos, entre otros. Las infecciones cutáneas

causadas por estos microorganismos suelen ser imprecisas destacándose el impétigo, como la lesión más importante y alcanzando la capacidad de llegar a producir hasta infecciones cutáneas necrosantes graves (Bush, Schmidt y Pérez, 2018, párr. 1-9).

Los estafilococos en general son bacterias inmóviles, no forman esporas y a la vez poseen cápsulas; sin embargo, en raras ocasiones son anaerobias, necesitan medios para crecer o factores de enriquecimiento como hemina y menadiona para su desarrollo. El microorganismo de *Staphylococcus aureus* presenta una característica muy particular que las diferencia de las demás especies, esta diferencia es la producción de la enzima coagulasa, esta permite a la bacteria coagular el plasma, ayudándole a que se agrupe a una denominación diferente como coagulasa positiva (Pahissa, 2009, pp. 18-19).

Según Pahissa (2009), el 20 % de la población es portadora permanente del *Staphylococcus aureus* en las fosas nasales y aproximadamente un 30 % de manera intermitente, por lo que este microorganismo puede llegar a colonizar otras áreas como la piel y el tracto gastrointestinal (p.24).

Los factores determinantes a la virulencia del *Staphylococcus aureus* es regulada a través de sistemas que son sensibles a las señales ambientales, según lo establecen Brooks et al. (2011), para regular la expresión de sus genes de virulencia codificados en islas de patogenicidad (pp. 203-205).

Análisis microbiológico del *S. aureus*.

El análisis microbiológico del *Staphylococcus aureus* requiere de pruebas bioquímicas y medios de cultivos especializados que logren su apta determinación, por lo que se diseñaron medios para aislar esta bacteria, dentro de ellos se encuentran: Agar Baird- Parker, agar salado manitol, agar estafilococos N° 110 y agar DNAsa (Medina, Casado y Torrico, 2012).

Pseudomonas

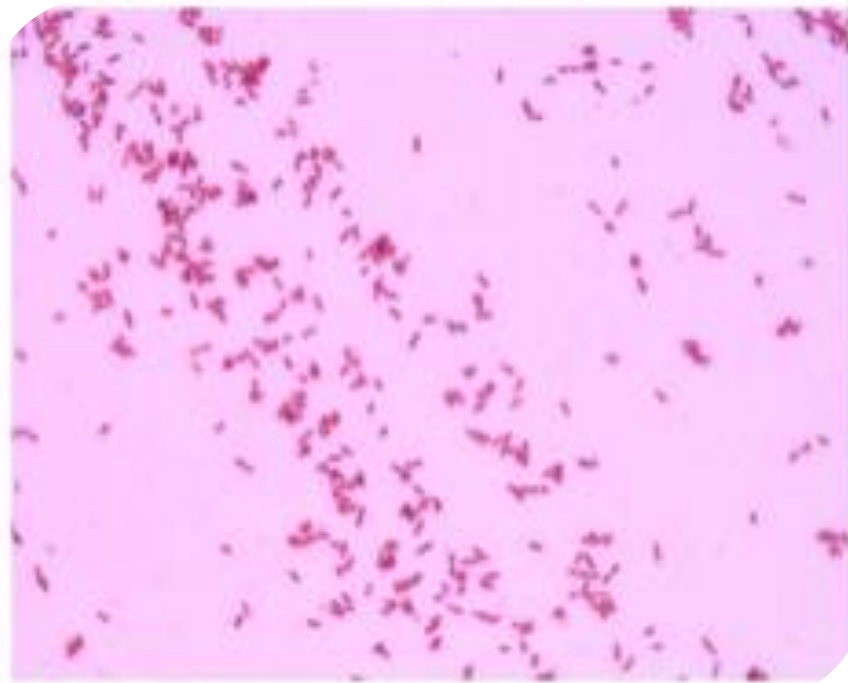
El grupo de las pseudomonas presentan una amplia distribución en el suelo y en el agua, son invasivas y producen infecciones en poblaciones que presentan defensas anormales. Estos

autores refieren también que la pseudomona es un patógeno muy común en áreas hospitalarias (Brooks et al., 2011, p.245).

Pseudomonas aeruginosa

Este microorganismo pertenece a bacilos Gram negativos, son móviles y de necesidad aerobia, suelen estar en pequeñas cantidades en microflora intestinal normal y en la piel del ser humano (Brooks et al., 2011).

Figura 3. Observación Microscópica *P. Aeruginosa*



Nota: Sabalette (2013)

Dentro de la epidemiología de la *Pseudomonas aeruginosa*, estos agentes prefieren optar por un ambiente húmedo, afectando a pacientes intrahospitalizados, específicamente a pacientes internados, y por sus características comprometen diferentes sitios anatómicos, tales como el tracto urinario, huesos, oídos, tejidos subcutáneos, generando una puerta de entrada a la septicemia por estos Gram negativos.

Según Luján (2014), *Pseudomona aeruginosa* es resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación organizada entre sí, esto debido a la disminución de la permeabilidad de su membrana externa, a la expresión constitutiva de varias bombas de expulsión y a la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos (p.466).

Como lo indica el mismo autor, entre los mecanismos asociados a una resistencia a los antibióticos para *Pseudomonas aeruginosa* destacan una resistencia intrínseca a varios de los cuales se liga a una limitada terapia de tratamiento para el ser humano.

Entre los principales antibióticos con resistencia natural para *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran la ampicilina, amoxicilina / ácido clavulánico, cefalosporinas de primera generación, cefotaxima, ceftriaxona, Ertapenem, Trimetropima-sulfametoxazol, tetraciclina (Luján, 2014, p.467).

La resistencia antimicrobiana abarca una serie de fenómenos que contemplan una curiosidad científica y una amenaza para la población humana, es por esta razón que, en el caso de los antibióticos, existe una preocupación que puede llegar a convertirse en un problema en el ámbito extrahospitalarios, por lo que compromete el hecho de que se puedan erradicar o superar las infecciones más comunes en la población mundial (Janilas, 2015, p.2).

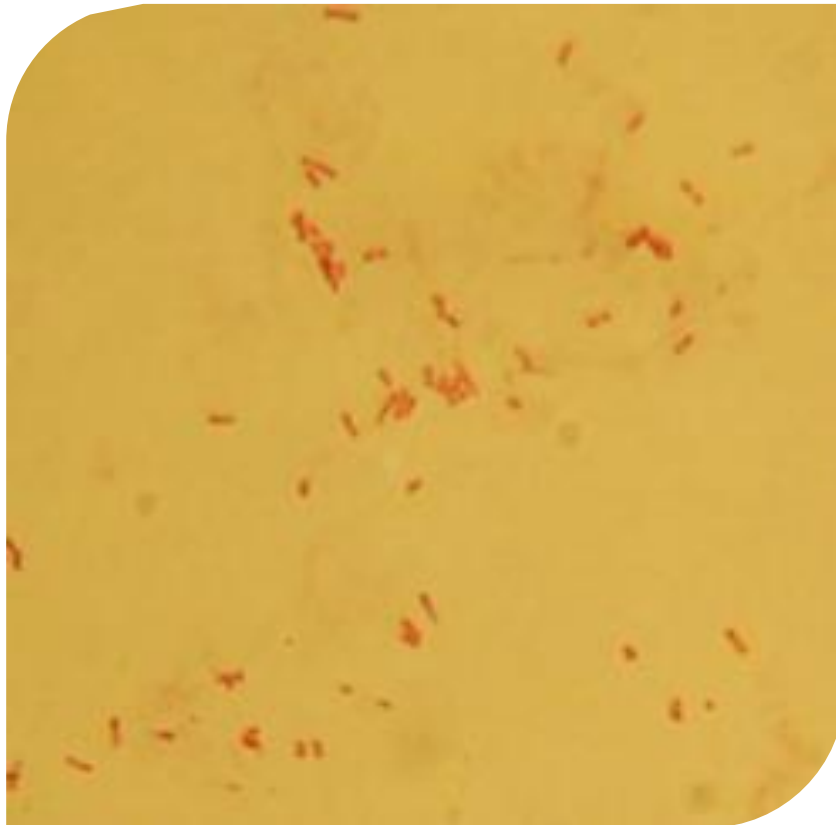
Díaz (2003) detalla que la resistencia bacteriana es asociada a una serie de mecanismos de defensa, siendo el más importante el sistema de expulsión activa del antimicrobiano. Este consiste en una especie de bomba expulsora que maneja bacterias utilizadas para la excreción de residuos o bien llamados tóxicos, con el fin de eliminar igualmente muchos de estos agentes antibacterianos (p.45).

Escherichia Coli

Escherichia coli presenta en el laboratorio clínico una forma de cultivo favorable, pero la identificación de los diferentes genotipos patógenos requiere de métodos de detección de genes de virulencia. Tiempo después del descubrimiento de este microorganismo se llegó a decir que, esta bacteria habita en el suelo y en el agua, por resultado de contaminación fecal. Clásicamente, su

detección se ha utilizado como un indicador de agua no potable y mala calidad de los alimentos (Salas, 2014, p.65).

Figura 4. Observación Microscópica de *E. coli*



Nota: García (2013)

Grupos patógenos de *E. coli*

Escherichia coli, se encuentra presente en mayor concentración en la microflora intestinal normal del ser humano. Sin embargo, en otras partes del cuerpo *E. coli* puede causar enfermedades graves, como infecciones de las vías urinarias, bacteriemia y meningitis (Oderiz, Leotta y Galli, p.6).

La detección de *E. coli* es posible llevarla a cabo mediante un adecuado ensayo de ADN, el cual es capaz de amplificar genes de virulencia específicos para cada uno de los tipos de *E. coli* diarreogénicos (Estrada, López, Saucedo, Thompson, López, y Rosado, 2009, p.93).

Resistencia de *Escherichia coli* a los antibióticos

Debido a la resistencia en la población mundial, Mosquito, et al. (2011) analizaron la importancia de revisar los mecanismos moleculares más comunes de resistencia en la *E. coli* con el fin de facilitar a personas del área biomédica, información actualizada y resumida sobre estos mecanismos, para poder así conocer e interpretar mejor este problema en la literatura médica. El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos complica el enfoque terapéutico de los pacientes infectados, por lo que ha llegado a ser un problema a nivel mundial presente en múltiples bacterias, en especial en la *Escherichia coli*, que tiene altos porcentajes de resistencia hacia antibióticos reconocidos, lo que se convierte en una dificultad al momento de un tratamiento antibiótico requerido. (p. 649).

Esto provoca que exista una adecuada vigilancia de resistencia, debido a que, si bien los mecanismos de resistencia surgen ante el uso de un antibiótico en específico, estos ocasionan de igual manera resistencia cruzada hacia otros antibióticos de la misma clase o con el mismo mecanismo de acción. Por lo que son piezas clave para políticas de control y uso adecuado de antibióticos.

Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana

La prueba destinada para la detección de sensibilidad a los antimicrobianos es primordial para la vigilancia frente a diferentes microorganismos, bajo la condición de poder lograr un adecuado uso de los antibióticos (López, 2013, p.16).

Este tipo de prueba es *in vitro*, dirigida a agentes patógenos de diversas especialidades, en lo cual la hace una prueba significativa, ya que mide la concentración del fármaco a requerir para inhibir el crecimiento del microorganismo, ya sea la concentración mínima inhibitoria (CMI), que esta se define como mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento posible de un inóculo bacteriano estandarizado; o la concentración mínima bactericida (CMB), que es la mínima concentración de un antibiótico que mata el 99,9 % de las bacterias de un inóculo inicial. (Herrera, 2018, párr. 16)

Una vez que el microorganismo se ha identificado, se puede llevar a cabo un estudio de la sensibilidad a una bacteria contra el antibiótico, a fin de determinar el tratamiento antibiótico apropiado. No obstante, existen otros procedimientos como, por ejemplo, dilución en agar, difusión en disco a través del método epsilométrico (p.16).

Como lo indica Herrera (2018), para lograr llevar a cabo las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, se cuenta en la actualidad con los siguientes métodos:

1. Difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby)
2. Dilución en agar
3. Macrodilución en caldo
4. Macrodilución en caldo
5. Epsilon test (E test)
6. Métodos automatizados
7. Pruebas especiales.

Una vez seleccionado el método a emplear para la prueba de sensibilidad antimicrobiana (PSA), se debe adecuar el medio de cultivo a emplear, el antibiótico y la cepa bacteriana.

Patrón o Escala de Mc Farland

El estándar o patrón McFarland es utilizado como patrón de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. Este patrón muestra una aplicación particular en la preparación de inóculos bacterianos, los cuales son adaptables para poder realizar una prueba de sensibilidad antimicrobiana (Becton Dickinson and Companys, 2005, p.1).

La mayoría del estándar de Mc Farland son preparados comercialmente por diversos fabricantes. Además, la turbidez a través del estándar Mcfarland se puede preparar con la adición de cloruro de solución de bario deshidratado, esta se debe almacenar a una temperatura ambiente y sellar con un papel parafilm para evitar la evaporación. (Medicina y laboratorio, 2009, p.9).

Por otra parte, los estándares McFarland son comparados visualmente con una suspensión de bacterias en solución salina, es decir, si la suspensión bacteriana es más turbia, se puede diluir

con más diluyente ya sea por solución salina o por caldo nutritivo. Si la suspensión no tiene la suficiente turbidez, puede adicionarse más cantidad de colonias. El patrón de McFarland más utilizado es al 0.5 % y corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de 1.5×10^8 células bacterianas por mililitro. (MDM Científica, s.f., p.1).

Figura 5. Composición de la Turbidez Estándar de McFarland

| Número de la turbidez estándar | Cloruro de bario dihidratado (1,175%) | Ácido sulfúrico (1%) | Densidad de bacterias aproximada correspondiente |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------|--|
| 0,5 | 0,5 mL | 99,5 mL | 1×10^8 |
| 1 | 0,1 mL | 9,9 mL | 3×10^8 |
| 2 | 0,2 mL | 9,8 mL | 6×10^8 |
| 3 | 0,3 mL | 9,7 mL | 9×10^8 |
| 4 | 0,4 mL | 9,6 mL | 12×10^8 |
| 5 | 0,5 mL | 9,5 mL | 15×10^8 |
| 6 | 0,6 mL | 9,4 mL | 18×10^8 |
| 7 | 0,7 mL | 9,3 mL | 21×10^8 |
| 8 | 0,8 mL | 9,2 mL | 24×10^8 |
| 9 | 0,9 mL | 9,1 mL | 27×10^8 |
| 10 | 1,0 mL | 9,0 mL | 30×10^8 |

Nota: Medicina y Laboratorio

Medios de Cultivo en Microbiología

Un medio de cultivo es aquella preparación sólida o líquida empleada

para cultivar, transportar y almacenar microorganismos. Los ensayos de medios de cultivo especializados son importantes en el aislamiento e identificación de microorganismos, en ensayos de sensibilidad a antibióticos, análisis de alimentos y de agua (Castillo, 2013, p.8).

Estos medios se caracterizan por alimentar a un microorganismo de manera que se puedan obtener los nutrientes necesarios para el crecimiento y el desarrollo de este (Montoya, 2008, p.203).

Tioglicolato

Es un caldo que fue diseñado por Brewer, utilizado para el favorecimiento de anaerobios, aerobios, microaerófilos y agentes patógenos exigentes, comúnmente es utilizado en la microbiología clínica. Igualmente, cabe destacar que este medio no solo reduce el potencial de oxidación- reducción, sino que también adquiere capacidad de poder neutralizar la actividad antibacteriana del compuesto relacionado con mercurio (Becton Dickinson and Companys, 2003, p.1).

El caldo tioglicolato tiene un estricto control de calidad durante el proceso de producción y al producto terminado, se le deben determinar ciertas especificaciones, tales como las que se encuentran a continuación (Cedeño, 2015, p.1).

Tabla 1. Aspectos Fisicoquímicos del Caldo Tioglicolato

| Especificaciones | Condiciones |
|--------------------------|---|
| Apariencia | Medio líquido de color ámbar ligeramente opalescente con anillo de resazurina de color rosado en la parte superior del tubo. |
| Color del medio sólido | Ámbar pálido ligeramente opalescente. |
| pH | 6,98 – 7,2 |
| Consistencia | Debe ser límpido y puede presentar algunas partículas pequeñas en suspensión de color rojo oscuro, propias de la presencia de resazurina en el medio. La transparencia no es total debido a la presencia de agar. |
| Volumen del medio | 5 ml de caldo en un tubo de ensayo. |
| Características del tubo | Tubo de vidrio borosilicato, capacidad para 9 ml, con una tapa de polipropileno. |

| | |
|---------------------------|---|
| Cierre hermético del tubo | El tubo debe estar sellado con banda termo encogible y completamente cerrado. |
|---------------------------|---|

Nota: Cedeño (2015)

Cabe destacar en la tabla anterior, que el anillo resazurina es un indicador redox, este permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de una tinción no fluorescente a un color rojo altamente fluorescente en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento celular (Cedeño, 2015, p.2).

Agar sangre

El agar sangre es un medio de cultivo utilizado principalmente para el crecimiento de estreptococos. Consiste en un medio no selectivo y nutritivo enriquecido con otros nutrientes como cloruro sódico (Cedeño, 2015, p.2).

La sangre empleada como aditivo para este método, es sangre de carnero diluida al 5 %, también la sangre puede ser de caballo, conejo e incluso humana. El agar sangre facilita las reacciones hemolíticas y puede o no contener sustancias inhibidoras del crecimiento de ciertos microorganismos.

Figura 6. Cultivo de *S. Aureus* en Agar Sangre

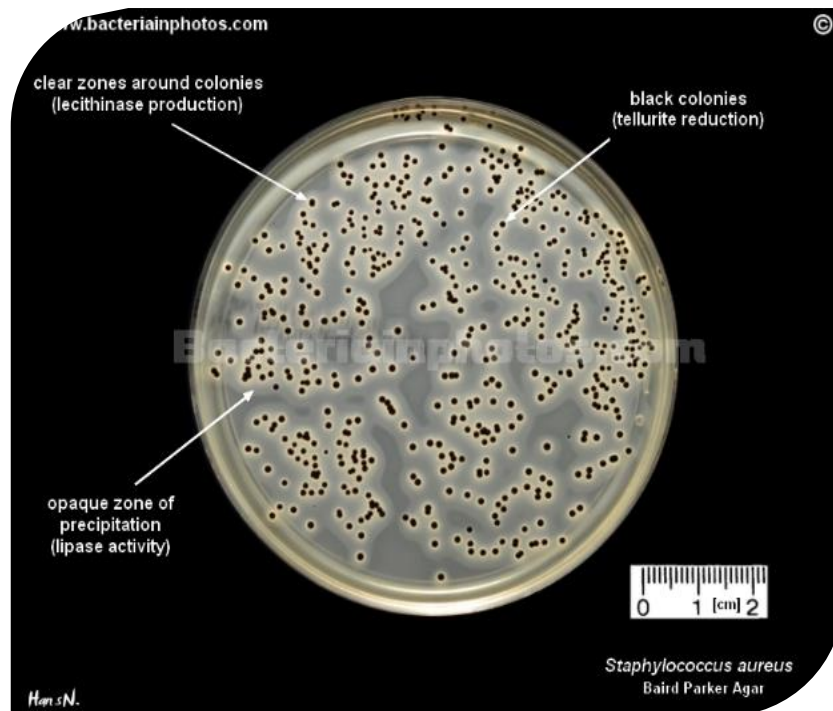


Nota: Sanz et al. (s.f.)

Agar Baird- Parker

Este medio es completamente selectivo, el cual se compone de piruvato sódico, ayudando a recuperar las bacterias lesionadas, asimismo, este posee un poder selectivo gracias a la presencia de telurito, cloruro de litio y glicina. La característica que indica la presencia de *Staphylococcus aureus* es un aspecto negro, revelando la actividad lipolítica (Zendejas, Ávalos y Soto (2014) y Casado, Torrico, y Medina 2012).

Figura 7. Cultivo de *S. Aureus* en Agar Sangre



Nota: Bacteria in Photos (s.f.)

Piel

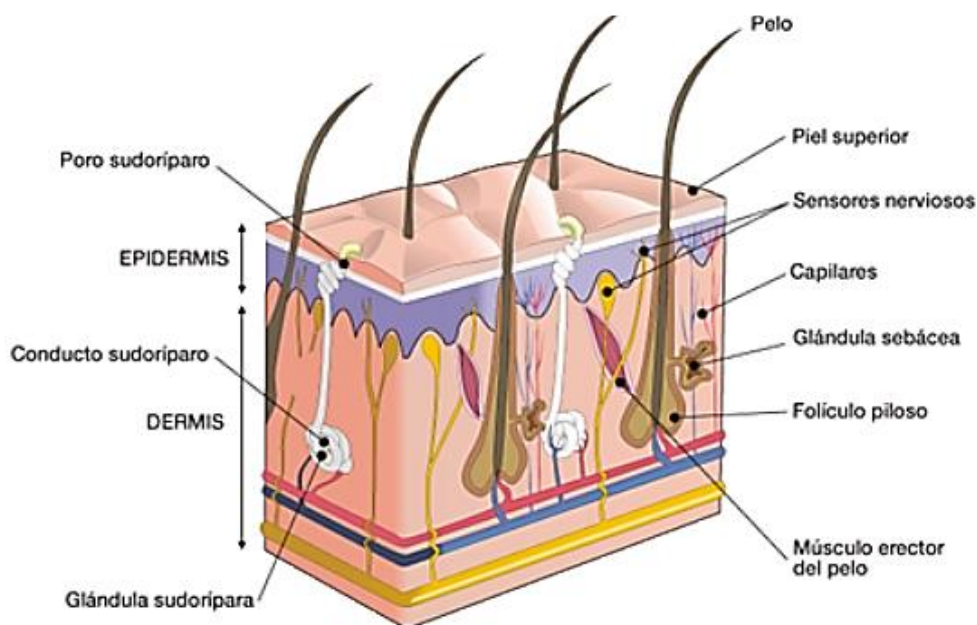
La piel está constituida por epidermis superficial delgada y una dermis profunda más gruesa; debajo de esta se encuentra el tejido subcutáneo. La epidermis es avascular mientras la dermis es vascularizada. El tejido subcutáneo también llamado hipodermis está constituido por tejido areolar y adiposo; aquí se almacena grasa y contiene vasos sanguíneos grandes, cuya función es irrigar la piel (Tortura y Derrickson, 2011, pp.153-177).

Características generales

La piel es un órgano con múltiples funcionalidades que son elaboradas por los tejidos que la forman. Este órgano es el más importante y amplio que se encuentra en el cuerpo humano desarrollado a nivel superficial, esto hace que proteja la piel contra la pérdida de agua y contra la invasión de microorganismos que causan diferentes enfermedades a lo largo de su extensión (Stuart Fox 2011, p.18).

La piel es el órgano encargado de nutrir a los vasos sanguíneos, sin embargo, la dermis contiene leucocitos que se desplazan de un sitio a otro, además de otros tipos de células que la protegen contra microorganismos invasivos que producen enfermedades. También contiene fibras nerviosas y células adiposas, donde estas se agrupan y forman la hipodermis (Fox, 2011, p.18).

Figura 8. La Piel y Sus Estructuras Especializadas.



Nota: Tortura y Derrickson (2011)

Funciones de la piel

La piel es fácilmente accesible, por eso posee uno de los adaptadores más importantes en el estado general de salud. Al mismo tiempo, tomando en consideración un diagnóstico diferencial de casi todas las enfermedades, la piel desarrolla múltiples funciones que hacen una importante exploración física (Moore, Dalley y Agur, 2010, p. 12).

Protección.

La protección da lugar al cuerpo para enfrentarse a efectos ambientales como las erosiones, pérdida de líquidos, sustancias nocivas, radiación ultravioleta y microorganismos altamente invasivos (Moore, Dalley y Agur, 2010, p. 12).

Contención.

Esta categoría hace relación a la contención de estructuras corporales, como tejidos y órganos, también sustancias vitales como los líquidos extracelulares, previniendo la deshidratación, que pueden llegar a ser graves en las lesiones cutáneas extensas (Moore, Dalley y Agur, 2010, p. 12).

Regulación térmica.

Se asocia con la evaporación del sudor, el cual regula, ya sea la dilatación o constricción de los vasos sanguíneos superficiales (Moore, Dalley y Agur, 2010, p. 12).

Sensibilidad.

Mediante los nervios superficiales desarrolla un papel importante como, ocasionar un estímulo doloroso por una lesión o por una quemadura, una vez ocurrido ese estímulo, inmediatamente se envían señales al sistema nervioso central para activar la liberación de mediadores químicos y dar inicio a la corrección de la lesión producida (Moore, Dalley y Agur, 2010, p. 12).

Flora normal de la piel

La flora cutánea fue detectada mediante cultivos microbiológicos. La microflora de la piel humana es analizada en cultivos microbiológicos con técnicas de frotis, raspado, lavado y contacto directo. (Soria y Carrasco, 2007, p.1).

La flora de la piel se asocia a infecciones importantes que participan en la homeostasis e intervienen en la defensa contra infecciones bacterianas a través de la interferencia bacteriana,

cuyas ventajas es facilitar la degradación de lípidos en la superficie cutánea favoreciendo la función de la barrera de la piel (Santamaria y Alvarado 2002, p.19).

La flora normal se obtiene con rapidez durante y poco después del nacimiento, cambiando la forma continua durante el crecimiento. (Pelczar et al. 2011, p. 440).

Enfermedades de la Piel

Impétigo.

Es una lesión en la piel causada por *Staphylococcus aureus*, puede presentar una apariencia de ampolla. Sin embargo, la forma ampollosa que ocasiona esta lesión es característica de la infección causada por este microorganismo o por *Streptococos aureus*. En caso de que sea producido, especialmente por *S. aureus*, este microorganismo elabora una toxina epidemiológica que da lugar al desarrollo de ampollas subcorneas que, al romperse producen exudación en grandes cantidades, llegando a producirse costras amarillas con restos de piel (Sellares y Moraga, s.f., p.27).

Figura 9. Impétigo Estafilocócico: Forma Neonatal



Nota: Sellares y Moraga (s.f.)

Celulitis.

La celulitis se define como una inflamación de la dermis y el tejido celular subcutáneo, causado por piógenos debido a una lesión en la piel. La lesión causada en la zona afectada podría encontrarse edematosa, eritematosa y con un aumento de la temperatura local de forma difusa (Carrasco, Rojas y de la Torre, 2016, p.2).

Foliculitis.

Es una afección tipo inflamatoria del folículo, el cual produce una pústula localizada en el ostium folicular (Suarez, s.f., p.30).

Foliculitis causada por pseudomonas.

Es una lesión causada por *Pseudomonas aeruginosa*, esta tiende a presentarse en el tronco, múltiples pápulas eritematosas localizadas centralmente, su sintomatología presenta un intenso prurito y dolor al roce. Asimismo, este puede presentar brotes abundantes constantemente al entrar en contacto temporalmente con la fuente de infección, ya sea desde el baño, o hasta las actividades cotidianas (Suarez, s.f., p.30).

Metabolitos Secundarios

Desde tiempos atrás se ha logrado implementar la utilización de plantas vegetales, estas aportan una variedad de compuestos como parte de la medicina tradicional, sin embargo, entre los compuestos principales que poseen actividad antimicrobiana en las plantas se destacan moléculas orgánicas elaboradas como sustancias de defensa y que no están implicadas en el crecimiento y en el desarrollo de un organismo, estas incluyen a los fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, terpenoides y alcaloides (Albán, 2017, p.8).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos tienen variaciones estructurales que se encuentran en la mayoría de las plantas, dentro los principales componentes que forman parte de este grupo están ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, ácido cafeico y clorogénico; poseen actividad inhibitoria frente a bacterias gram positivas, gram negativas, hongos y levaduras, en los seres humanos favorecen la secreción de bilis y reduce el colesterol (Albán, 2017, p.9).

Coffea arábica

El cultivo del *coffea arábica* es el tipo de café más delicado, menos productivo y está ubicada en tierras altas de montaña, entre los 900 y 2000 metros sobre nivel del mar. Este cultivo es originario de Etiopía, también se desarrollan en países de alto desarrollo como Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Guatemala, Haití, Jamaica, México, Perú, Puerto Rico, República Dominicana, El Salvador, y Venezuela (Pérez, 2018, p.2).

Este fruto es una drupa verde que se torna roja al madurar. Cuando el grano es recolectado, se pone en agua para quitarle la pulpa y esta se pueda fermentar; posteriormente el grano se descascará, y se seca exponiéndolo al sol, para luego tostarlo y molerlo (Morales, 2009, p.58).

Este cafeto es un estimulante del Sistema Nervioso, disminuye el sueño y provoca fatiga. Además, como lo indica Morales (2009) tiene propiedad diurética, gástrica, disminuyendo la secreción gástrica y la actividad cardíaca. Sin embargo, estudios han revelado que la tolerancia a la cafeína varía según la población (Morales, 2009, p.58).

Clasificación taxonómica

El café es una planta proveniente de la familia *Rubiaceae*, genero *Coffea* y especies *C. arabica* y *C.canephora*, principalmente, además de *C. Liberica* (Alvarado y Rojas, 2007, p.11).

Tabla 2. Clasificación Taxonómica del *Coffea arábica*

| Clasificación Taxonómica | |
|---------------------------------|------------------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Subdivisión | Angiospermae |
| Clase | Magnoliata |
| Subclase | Asteridae |
| Orden | Rubiales |
| Familia | Rubiaceae |
| Género | <i>Coffea</i> |
| Especie (s) | Arábica, canephora, liberica |

Morfología del café

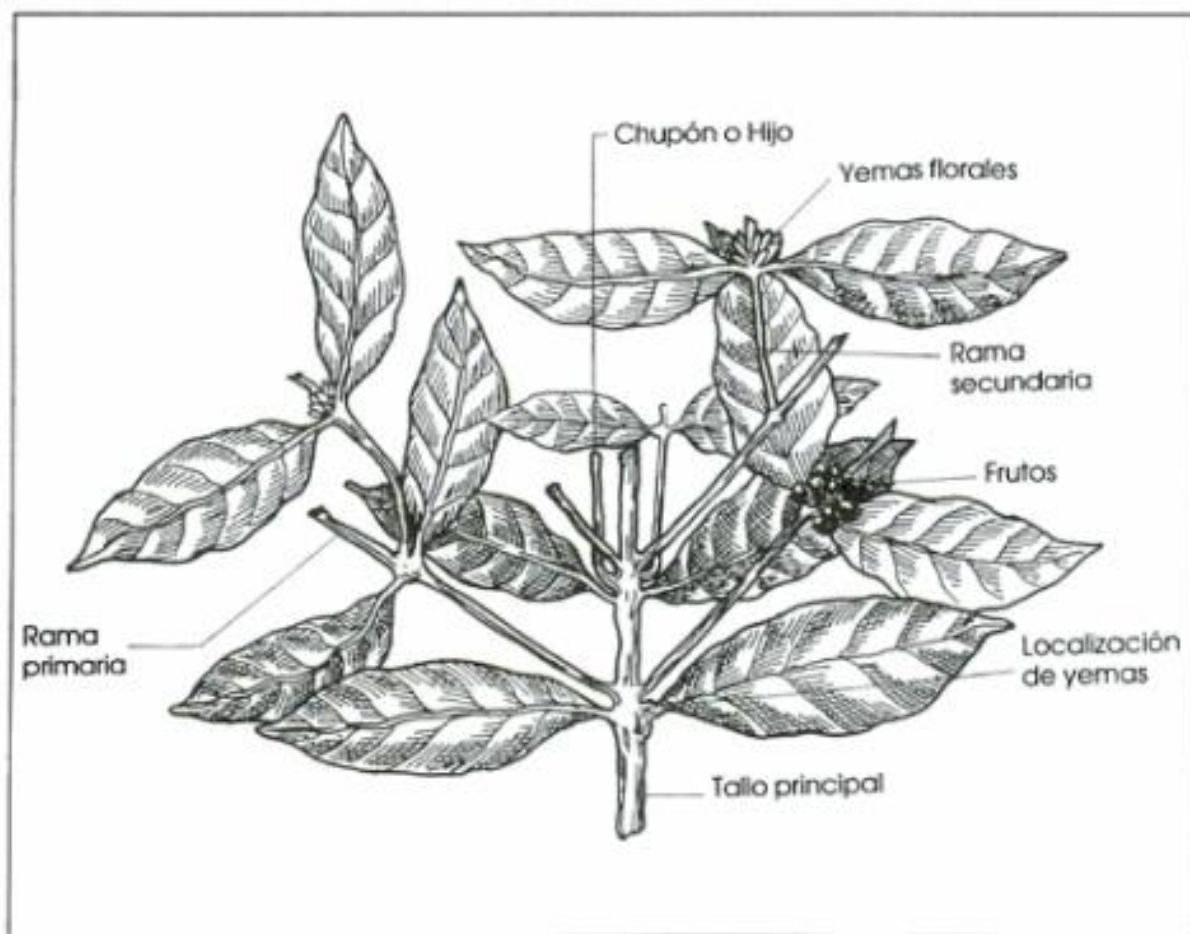
Raíces.

En las raíces presentan una variedad de clases como, pivotante, axiales, laterales y raicillas. Estas presentan diferentes posiciones según su suelo, sin embargo, se destaca que las raicillas son las importantes, pues permiten a la planta una mayor absorción de agua y nutrimentos a partir del suelo (Alvarado y Rojas, 2007, p.11).

Tallo.

Este es leñoso, erecto y de longitud variable, de acuerdo a las condiciones climatológicas y al tipo de suelo donde se cultive, presenta en su parte inferior una forma cilíndrica, mientras que, en su parte superior es cuadrangular y verde, sus esquinas son redondas y salidas. Además, tienen la particularidad de presentar tres tipos de yemas: tallo, bandolas y hojas (Alvarado y Rojas, 2007, p.11).

Figura 10. Morfología de la Parte Superior del Café



Nota: Alvarado y Rojas (2007)

Ramas o bandolas.

Estas se presentan de manera alterna y dan origen a las ramas secundarias. Por otro lado, las ramas que son adaptadas lateralmente presentan un punto apical de crecimiento que va formando nuevas hojas y entrenudos, toda esta descripción. (Alvarado y Rojas, 2007, p.12).

Flores.

Estas presentan en su parte axial, yemas florales de 1 a 3 ejes, en los que se ramifican para así coronar cada una en una flor formadas por cáliz, corola, estambres y pistilo (Alvarado y Rojas, 2007, p.12).

Fruto.

Es una superficie brillante y lisa, con una pulpa delgada, constituida por partes diferentes como el pericarpio, dividiéndose en la cascara (epicarpio), pulpa y mucilago (mesocarpio), y el pergamino (endocarpio), el cual cubre cada una de las semillas pertenecientes, finalmente y en el interior de cada una de las semillas se encuentra el germen o embrión (Alvarado y Rojas, 2007, p.13).

Tal como lo indica Salas (2000), el grano de café está constituido por un albumen córneo cuyos tejidos contienen almidón, sustancias grasas, azúcares, sacarosa, taninos y cafeína, en un extremo de esta planta se encuentra el embrión de la raicilla cónica y cotiledones. Reciben el albumen dos envolturas, la primera en el endocarpio (Parche), del fruto (drupa) y la segunda muy fina es el tegumento seminal (Película) (p.13).

Semilla.

Su principal composición la hace en relación con el endospermo, encontrándose en la parte basal con un tamaño muy reducido. Esta se encuentra protegida por una cubierta muy delgada,

conocida como película plateada y que esta a su vez es protegida por el pergamino. (Alvarado y Rojas 2007, p.13).

Figura 11. Estructura del Fruto de Café



Nota: COOPEDOTA (2018)

Procesamiento del café

Acuña, K., Argüello, J., Espinoza, J., González, M., Vega R. (2011) describen el procedimiento de producción del cultivo del café. Se obtuvo la siguiente información por parte de COOPEDOTA (2018).

Antes de establecer las compañías cafetaleras en Costa Rica, el procesamiento de café existía como una producción cafetalera familiar con respecto a una zona geográfica, donde utilizaban solo un tipo de método. Sin embargo, el primer método utilizado fue el seco por tener un muy bajo costo, luego con el paso de los años la evolución propia del cafeto cambio de manera radical a una mejor calidad y sabor empezando a utilizarse el método húmedo (Acuña et al., 201, p.25).

Proceso de la extracción de la semilla en húmedo.

A este proceso se la llama también, lavado o fermentado. Al café después de ser lavado, se le retira la cáscara y se despulpa la cereza, una vez que esto está bien elaborado, se asegura que las cualidades íntimas de los granos de café logren tener una apta conservación.

En este proceso, las cerezas después de ser recolectadas se depositan en un recibidor que las conducirá mecánicamente a una máquina encargada de retirar la cáscara del grano. Las semillas, antes de llegar a esta máquina separadora de cáscara, presentan una fase de limpieza profunda mediante drenajes donde se clasifican las semillas y la basura, por ejemplo, hojas de la planta de café (Acuña, K., et al. p.25).

Proceso de torrefacción.

Este proceso corresponde a la operación en el cual son formados bajo calentamiento, cocción y secado. Durante este proceso el pergamino que rodea el grano es retirado, al mismo tiempo, se eligen los granos que irán al proceso de tostado (Acuña, K., et al. p.29).

Proceso de tostado.

En esta fase del proceso, el tostado es el más difícil, ya que, si se excede el tiempo de tueste, este originaría un sabor completamente distinto a lo deseado.

Los granos de café por medio del calor aumentan su tamaño y desperdician por completo cualquier tipo de humedad que haya quedado, por lo que el calor también genera los aromas que no existían previamente (Acuña et al. p.29).

Proceso de molido.

En este proceso el café se muele dependiendo de las especificaciones de preparación, ya que puede ser de preparación instantánea, expreso o para colar. Este es el último proceso, a partir de acá está listo para ser empacado en las diferentes presentaciones que puede ofrecer la industria, así como las diversas aplicaciones en otros campos que se le pueden dar (Acuña et al. p.29).

Composición química del *Coffea arábica*

A continuación, se presenta la composición química del fruto del café según Dorado (2013):

Tabla 3. Composición Química del Café

| Componente químico | Arábica (%) |
|---------------------------|--------------------|
| Polisacáridos | 50.8 |
| Sacarosa | 8.00 |
| Azúcares reductores | 0.10 |
| Proteínas | 9.80 |
| Aminoácidos | 0.50 |
| Cafeína | 1.20 |
| Trigonelina | 1.00 |
| Lípidos | 16.20 |
| Ácidos alifáticos | 1.10 |
| Ácidos clorogénicos | 6.90 |
| Minerales | 4.20 |
| Compuestos aromáticos | trazas |

Nota: Dorado (2013)

Dorado (2013) define cada uno de los componentes químicos que corresponden al café arábica, presentando diferentes características, muy particulares en cada uno de ellos, encontrándose:

Ácidos grasos.

Los ácidos grasos que forman parte de los triglicéridos son los que adquieren capacidad como aceite, de acuerdo al comportamiento como nutriente y adquieren un uso particular en la industria. Además, los ácidos grasos no son ramificados y contienen un par de átomos de carbono (Dorado, 2013, p.32).

Compuestos volátiles del café.

Entre los distintos componentes aromáticos en el residuo de café, pueden destacarse los siguientes: compuestos alifáticos (hidrocarburos, alcoholes y compuestos carbonílicos), que se forman a través de la descomposición de hidratos de carbono; los compuestos aromáticos, como los fenoles, son procedentes de la degradación de los ácidos clorogénicos, ésteres y ésteres fenólicos; y compuestos heterocíclicos como los furanos, estos son procedentes de la pirolisis de los azúcares, pirroles, tiofenos, oxazoles y tiazoles (Dorado, 2013, p.35).

Entre las principales familias de compuestos presentes en el aroma de café tostado, se encuentran:

Compuestos fenólicos.

Estos compuestos se encuentran en bajas concentraciones, incrementándose con el grado de tueste. Son característicos de los café robusta y los cafés de tueste fuerte, donde las concentraciones de los fenoles alargan a ser relativamente altas (Dorado, 2013, p.36).

Pirazinas.

Estos compuestos por sí mismos tienen un aroma a maíz dulce y amargo. La presencia de un grupo tiol en las Pirazinas imparte un aroma a nuez y galleta (Dorado, 2013, p.35).

El café arábigo (*Coffea arábica*) y robusta (*Coffea canephora*) se encuentra una composición idéntica a las pirazinas (Plasencia, 2012).

Piridinas.

Estos compuestos como tal, tienden a aumentar según el grado de tostación, por lo que se dice que en los cafés arábigos al igual que en los robusta se presentan condiciones similares. Las piridinas poseen unas notas amargas, astringentes y tostadas (Dorado, 2013, p.35).

Pirroles.

Los pirroles aumentan según el grado de tueste. Se encuentran en mayor concentración en los cafés arábigos más que en los robusta y poseen diferentes olores (Dorado, 2013, p.35).

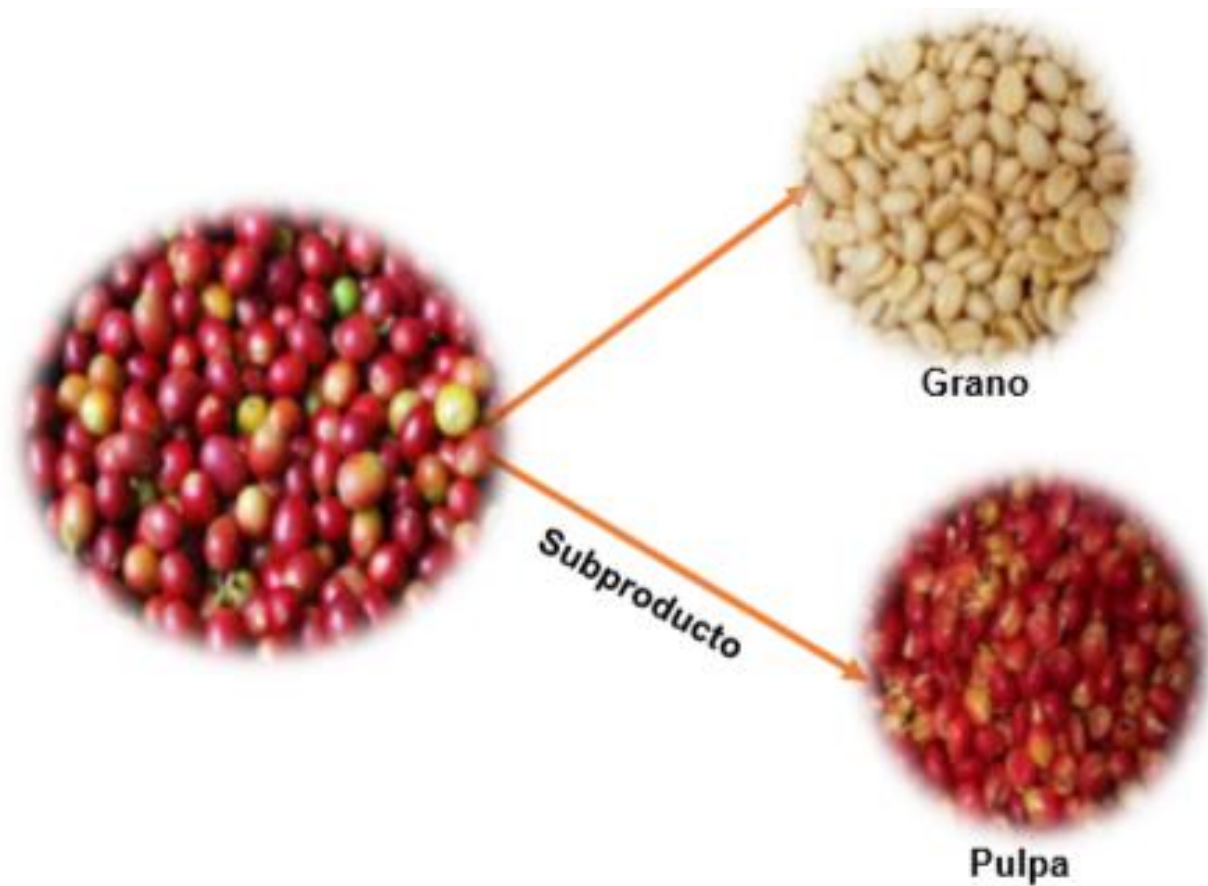
Furanos.

Se forman por la degradación pirolítica de azúcares y tienen un aroma a caramelo o azúcar quemada. Se encuentran en una mayor cantidad en el café (Dorado, 2013, p.35).

Subproductos del café

Dentro de los diferentes subproductos que abarca el café se encuentran: la pulpa de café, el mucilago y el pergamino, también llamado “cascarilla” (Albán, 2017, p.8)

Figura 12. Subproducto del Café



Autor: Albán (2017)

Pulpa o broza del café.

Es el producto extraído durante todo el proceso del café, pasado por la etapa de tostado y molido, en el cual se les ha extraído sus componentes solubles en agua.

Figura 13. Pulpa o Broza del Café

Por otro lado, se descubren propiedades organolépticas asociadas a este subproducto, mencionadas a continuación (Calle y Mendoza, 2017):

Tabla 4. Composición Física de la Broza del Café

| Propiedad organoléptica | Descripción |
|---|--------------------------|
| Color | Café claro |
| Olor | Característico a tostado |
| Aspecto | Café tostado y molido |
| Densidad aparente | 0.28 g/cm ³ |
| Humedad | 75-80 % |
| Contenido de aceite | 10-15 % |
| Temperatura del agua para su extracción | 170-180 °C |
| Presión | 14- 16 Bares |

Nota: Calle y Mendoza (2017)

Composición química del extracto del café arábica.

El extracto del café es uno de los productos que se logra obtener a través de un proceso, en el que se hace pasar por agua caliente sobre su lecho fijo de café tostado y molido a determinada temperatura y presión, con el fin de extraer sólidos y componentes aromáticos del grano de café (Conforme y Loor, 2016, p.12).

Según el Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE) (2011), se llevó a cabo la determinación de la composición química mediante una taza del extracto de café arábica, que se detalla a continuación:

Tabla 5. Composición Química del Extracto de Café Arábico

| Composición | Descripción |
|----------------------------|--------------------|
| Agua | 98.75 % |
| pH | 4.89 |
| Aporte calórico sin azúcar | 1 kcal/100 mL |

Nota: Conforme y Loor (2016)

Tabla 6. Componentes Orgánicos Presentes en la Broza del Café

| Componente | Porcentaje |
|-------------------------|-------------------|
| Aceites | 10-15 % |
| Taninos | 0,78- 5,60 % |
| Lignina | 8,72- 9.15 % |
| Celulosa y hemicelulosa | 36- 37 % |
| Carbohidratos | 34- 39 % |

Nota: Calle y Mendoza (2017)

Utilización de la broza o pulpa de café.

En la industria cafetera solo se utiliza el 9,5 % del grano para la elaboración de la bebida, el resto que es el 90,5 % corresponde a subproductos de café, encontrándose un 41 % de pulpa, un 16 % de mucilago y un 4 % de la cascarilla. Estos subproductos al no ser aprovechados generan una gran contaminación, por lo que sería de gran interés poderlos utilizar por la presencia de compuestos como taninos, cafeína y ácidos clorogénicos (Albán, 2017, p.19).

Fitofármacos

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2017), los fitofármacos son aquellos productos adquiridos mediante métodos tecnológicos adecuados, donde se emplea materia prima de origen vegetal. Se caracteriza por su eficacia y el conocimiento de los riesgos de su uso.

Si bien es cierto la falta de expansión localiza a los fitofármacos en un mundo intermedio entre la medicina formal y la medicina tradicional herbolaria, entre lo científico y lo empírico, lo que provoca en el personal de ciencias de la salud, el desconocimiento acerca del lugar que deben ocupar los fitofármacos en la sociedad. El fitofármaco es un recurso terapéutico de gran valor que le garantiza al paciente que opte por esta alternativa, seguridad y eficacia mediante los estudios realizados (Romero, Reyes, Herrera y Lozoya 2003, p.126).

Uso de Plantas Medicinales

Según Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 % de la población a nivel mundial, especialmente en los países en desarrollo, utiliza tratamientos tradicionales a base de plantas para sus necesidades de atención primaria de salud. No obstante, en esos países ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales. Su disponibilidad se ha visto reducida por la degradación de los ambientes naturales u otros fenómenos que le pueden llegar afectar (OMS, 2018).

Por otra parte, en cuanto a la investigación sobre el uso de plantas medicinales, esta forma parte de la etnobotánica, que ha sido definida como el estudio de las interrelaciones entre el ser humano y las plantas. Por su naturaleza interdisciplinaria abarca muchas áreas: botánica, química, medicina, farmacología, toxicología, nutrición, agronomía, ecología, sociología, historia y arqueología; lo cual permite un amplio rango de enfoques y aplicaciones (Bermúdez, Miranda y Velázquez, 2005, p. 455).

El uso de plantas medicinales se viene dando desde la antigüedad y está relacionado con la cultura indígena. El estudio de los componentes a través de las plantas medicinales se engloba en determinadas sustancias que ejercen una acción de farmacología sobre el ser humano o los seres vivos. Las sustancias o bien llamados principios activos pueden darse a partir de sustancias simples como los alcaloides o mezclas complejas como resinas, aceite esenciales o extractos a partir de plantas naturales (Pérez, 2008, p.4).

Tabla 7. Formas Más Comunes de Uso de las Plantas con Propiedades Medicinales

| Forma | Propiedad medicinal |
|--------------------|---|
| Aceites esenciales | Antisépticos Estimulantes Expectorantes |
| Aguas aromáticas | Relajantes Antioxidantes Hidratantes |
| Extractos | Antioxidantes Cicatrizantes |

Nota: (Pérez 2008)

Beneficio en el uso de plantas medicinales

La investigación científica ha permitido descubrir una extensa variedad de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos o heterósidos, las gomas, y los taninos (Bruneton, 2001).

Bruneton (2001), describe que en las plantas se encuentran presentes principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales, como las vitaminas, minerales, aminoácidos, carbohidratos y fibras, azúcares diversos, ácidos orgánicos, lípidos y los antibióticos.

A pesar de que la finalidad terapéutica es natural, muchas de las personas que optan por la fitoterapia no son conscientes de que todos los preparados que se utilizan son de forma preventiva, curativa o para el alivio sintomático, y que han sido elaborados a base de plantas medicinales, y que a pesar de ello son medicamentos y que, por tanto, pueden interferir con la medicación habitual y un uso inadecuado puede tener riesgos para la salud (Mesenguez, 2007).

Consecuencias del uso de las plantas

Las interacciones farmacodinámicas como lo describen Vila (2009), resultan poseer efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos entre fármacos y plantas con las mismas propiedades farmacológicas, es por eso por lo que una de las preocupaciones al desarrollar la fitoterapia es la combinación de medicinas tradicionales y fármacos modernos, ya que las creencias que rodea la medicina tradicional a veces pueden interferir con los tratamientos modernos (p.23).

Según Vila (2009), la mayoría de las interacciones entre plantas y fármacos que afectan la absorción lo crean reduciendo los niveles del fármaco, ya sea por la alteración del pH digestivo, afectando la motilidad, o por la formación de complejos no absorbibles (p.25).

Según lo citado por el anterior autor, el metabolismo de fármacos es el mecanismo más importante de interacciones y una buena muestra de ello son los fármacos que ven afectados sus niveles cuando se administran juntamente con hipérico, un inductor del citocromo P450 (p.25).

Se puede destacar que en la población que presente un tipo de afección renal, pueden acumular fármacos que se eliminan por excreción renal, y plantas con propiedades diuréticas

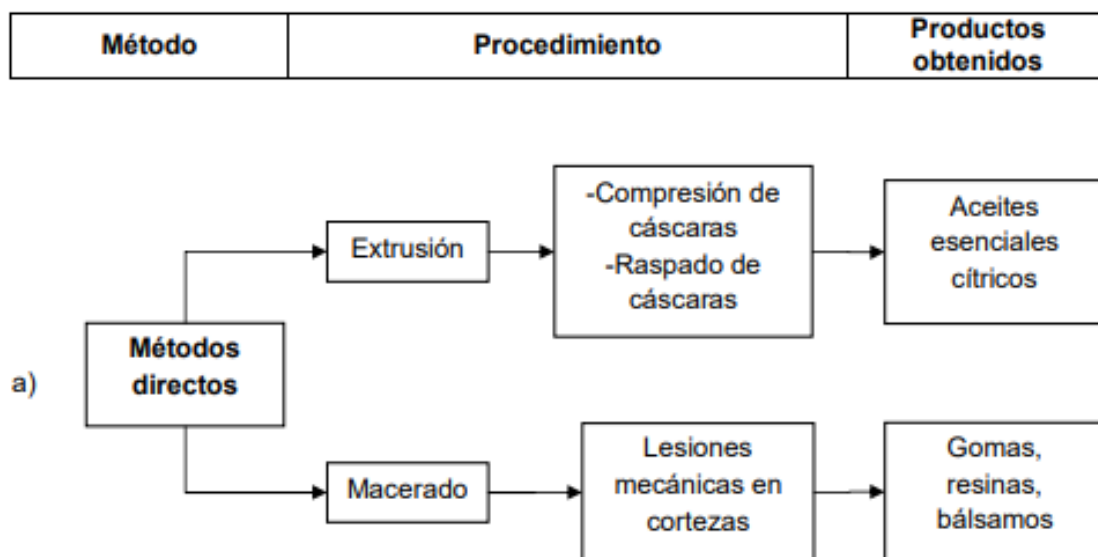
acelerarían la excreción, al igual que las que pueden alterar el pH urinario podrían influir en las concentraciones urinarias de fármacos que son ácidos o bases débiles (p.26).

Métodos de Extracción de Aceites Esenciales y de Extractos Vegetales

Según Contreras y Ruiz (2012), para la obtención de un extracto o aceite esencial respecto a un material vegetal, se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en determinada planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo (p.36).

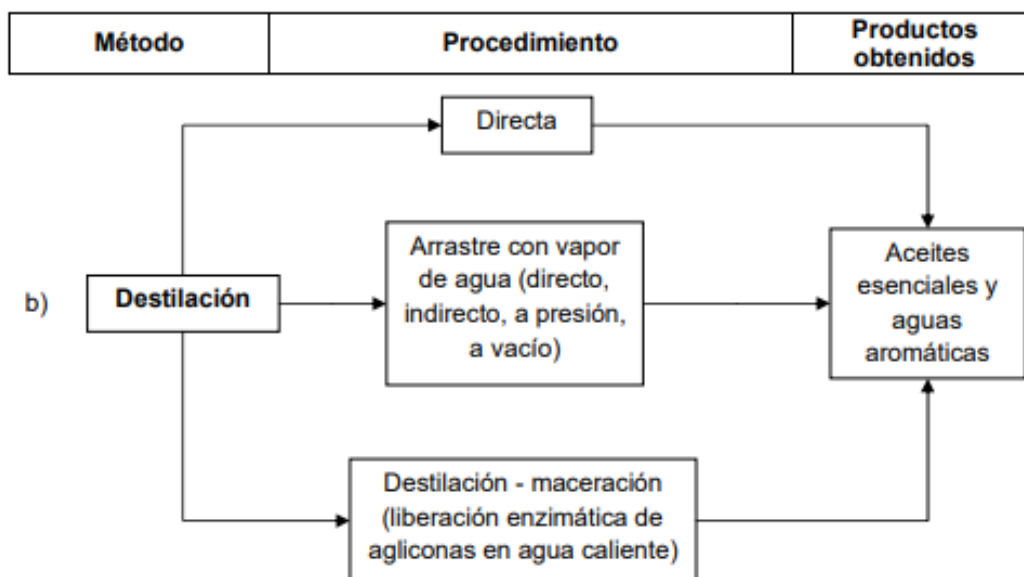
A continuación, se citarán los métodos de extracción más importantes:

Figura 14. Métodos Directos de Extracción



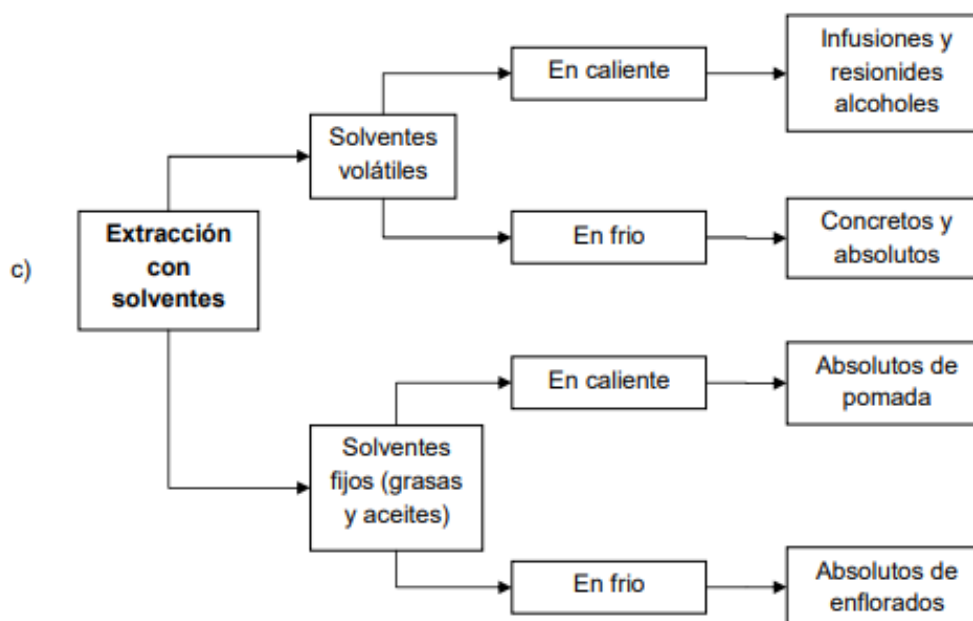
Nota: Contreras, E y Ruiz, J. (2012).

Figura 15. Método de Extracción a través de la Destilación



Nota: Contreras y Ruiz (2012)

Figura 16. Método de Extracción a través de Solventes Orgánicos



Nota: Contreras y Ruiz (2012).

Método Soxhlet

La elección del método extractivo y del disolvente está determinada por la naturaleza fisicoquímica de los metabolitos que se quieren aislar y por la restricción de no producir alteraciones en ellos.

El método Soxhlet fue inventado por el químico alemán Franz Ritter Von Soxhlet, en el año 1879, donde por primera vez, según comenta Infante (2016) se hizo el experimento para determinar la grasa de la leche, en la cual se utilizó un sifón a nivel constante que fue utilizado para devolver el extracto a un matraz con disolvente después de la finalización de un ciclo determinado de extracción (p.26).

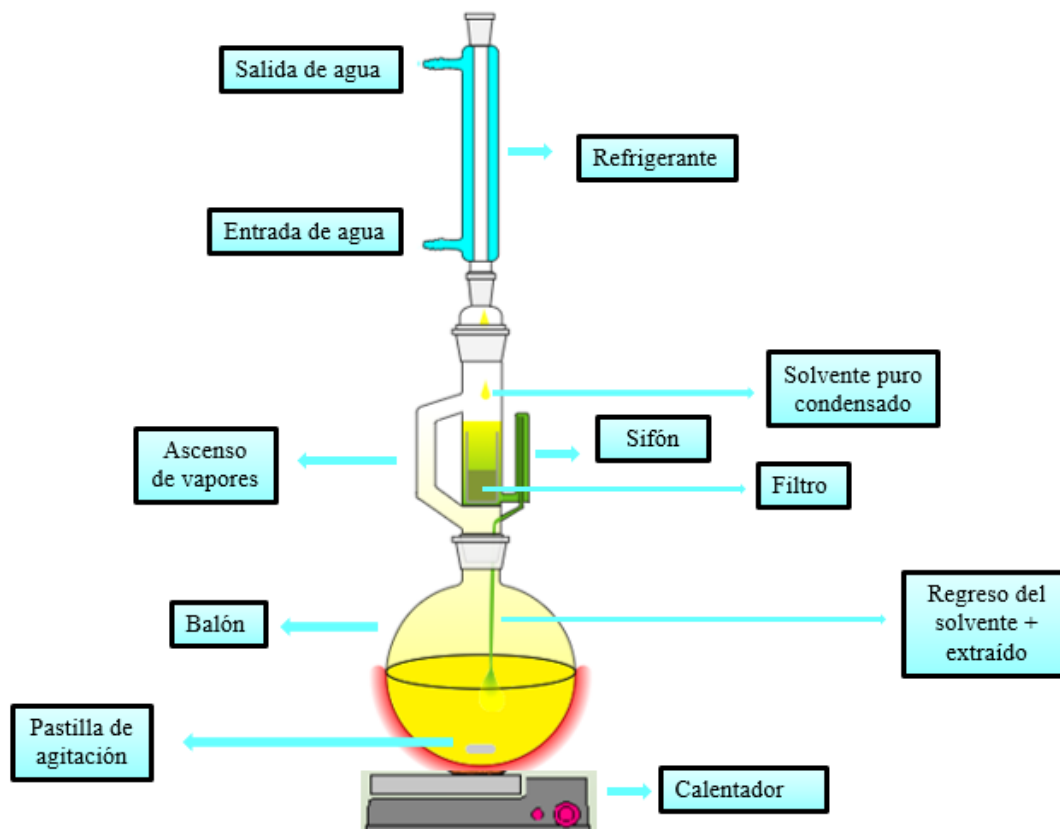
Este método como lo indica este autor es utilizado para la acción de separar a través de un líquido una fracción específica de una determinada muestra, dejando el resto lo más íntegro posible, dándose la extracción desde los tres estados de la materia (Infante, 2016: pp. 26-28).

1. Extracción sólida – líquido
2. Extracción líquida- líquida
3. Extracción Gas- Líquida

Función del método Soxhlet.

Según Caldas (2012), el equipo utilizado para la extracción de materia vegetal en cualquiera de sus tres estados tiene como función recircular los vapores condensados, con ayuda de un sifón, a la fuente de disolvente que se encuentra en una evaporación continua, arrastrando consigo los principios activos de la materia prima contenida en los cartuchos desechables (p.19).

Figura 17. Equipo Soxhlet



Nota: Autor

Ventajas y desventajas de la extracción Soxhlet según (Caldas 2012, p.22):

Ventajas.

- Mayor capacidad de recuperación y su instrumentación es relativamente sencilla.
- El disolvente viene a partir de una condensación, luego es líquido y se encuentra caliente por lo que favorece la solubilidad del analito.
- El disolvente y la muestra por evaluar se encuentra siempre en contacto inseparable y periódico, de manera que se mejora muchísimo más la extracción porque siempre se emplea un disolvente limpio.

Desventajas.

- Es un proceso que requiere de mucho tiempo ya que es lento e imposible acelerar.

- Se necesita de una cantidad de disolvente en cantidades mayores.
- No puede ser utilizado para analitos termolábiles y que se puedan llegar a descomponer con el calor o reacciones entre ellos.

Etapas de extracción Soxhlet.

Según Núñez (2008), la extracción a partir de este método consiste en montar el sistema a través de diferentes fases (p.2).

1. Colocación del solvente de acuerdo con las condiciones del método en un balón.
2. Ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo.
3. Etapa donde el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior.
4. Ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que retorna el solvente con el material extraído al balón.
5. Una vez originado este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón del solvente.

Solventes más convenientes para utilizar el método de extracción Soxhlet.

Como lo refiere Caldas (2012), para seleccionar un solvente adecuado de manera que proporcione un balance de acuerdo con las características de la muestra se debe tener en cuenta las siguientes condiciones (p.20):

- Alto límite de saturación y selectividad respecto al soluto o al material vegetal a extraer.
- Estabilidad química en las condiciones del proceso.
- Menor viscosidad y presión de vapor.
- Poca toxicidad e inflamabilidad.

Otra condición importante en cuanto a la utilización del método de extracción Soxhlet es el tipo de solventes que presenta un carácter no polar, por lo tanto, pueden llegar mostrar alguna dificultad según lo describe Núñez (2009, p.2).

Tabla 8. Puntos de Ebullición de los Solventes Utilizados con Mayor Frecuencia en el Método Soxhlet

| Solvente | °C |
|-----------------|-----------|
| Éter | 35 |
| Diclorometano | 40 |
| Cloroformo | 62 |
| Metanol | 65 |
| Hexano | 69 |
| Benceno | 80 |
| Etanol | 78 |
| Acido fórmico | 101 |
| Tolueno | 111 |

Autor: Núñez (2008)

Equipo por arrastre de vapor

Según Peredo et al. (2009) se lleva a cabo a través de la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros “no volátiles”. Lo anterior se logra por medio de la inyección de agua de manera directa en el seno de la mezcla, ya que la función de este es condensar formando una fase miscible, por lo que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporización (p.3).

Por otro lado, una de las condiciones que menciona el mismo autor para que este tipo de destilación pueda ser aplicado es que tanto el componente volátil como una impureza sean insolubles en agua.

Figura 18. Equipo Arrastre por Vapor



Nota: Aguilar (2012)

Equipo Rotavapor

Lo particular de este equipo es que la utilización de la presión es reducida, es decir, que se pueden llevar fluidos a ebullición a temperaturas menores a las comunes y controladas. También, se lleva a cabo una rotación de los elementos, lo cual está destinado para ampliar la superficie que recibe el calor, haciendo de este procedimiento algo más acelerado. La ventaja principal de ello se ve en que es posible realizar estos procesos conservando las propiedades organolépticas, químicas y bioquímicas de las sustancias, sin añadir aditivos y sin la presencia de variaciones en el producto.

Figura 19. Equipo Rotavapor Yamato



Nota: Cocina Intermedia

Solventes

Recinos (2004) habla de la caracterización de un solvente como aquel líquido que se introduce en una o más sustancias para construir una fase homogénea, es decir, la solución. El autor destaca que los solventes no van de acuerdo con alguna estructura química, sino que van en condición a su estado físico y químico.

Clasificación de los solventes

La condición que se engloba en la clasificación de un disolvente va de acuerdo con la polaridad, ya que crea una diferencia en la carga eléctrica sobre varias porciones de una molécula.

Por lo que los solventes pueden catalogarse de dos maneras diferentes: polares y no polares (Recinos, 2004, p. 6).

Solvente polar.

Estos solventes adquieren una mejor capacidad de solvatación que el resto de los solventes. Asimismo, es utilizado para formar soluciones con resinas vinílicas, acrílicas, nitro celulósicas, epóxidos. Además, presenta una versatilidad que las hace muy importantes (Recinos, 2004, p.7).

Este autor a la vez hace pie a un ejemplo clásico de un solvente polar, muy utilizado universalmente como lo es el agua. También pertenecen aquellos alcoholes que tengan un bajo peso molecular.

Solvente no polar.

Son aquellos que presentan capacidad de disolver sustancias no hidrosolubles y que por sus propiedades disolventes tienen múltiples aplicaciones en varias tecnologías industriales. Algunos disolventes convencionales de este tipo son el éter dietílico, cloroformo, benceno, tolueno, cetonas, hexano (Recinos, 2004, p. 8).

Caracterización Química

La composición que se logra dar en las diferentes materias vegetales es gracias a métodos de identificación de compuestos que pueden ser identificados, los que se detallaran a continuación:

Pruebas de identificación

Los extractos vegetales tienen la capacidad de disponer una serie de reacciones químicas que permiten caracterizar grupos funcionales. En algunos casos varios grupos funcionales pueden dar una misma reacción por lo que es necesario aplicar una u otra reacción que sea característica, para saber realmente de la naturaleza de estos.

A continuación, se hace mención de alguna de las pruebas de por grupo de metabolito secundario que se pueden aplicar en el laboratorio (Marcano, 2000, p.32):

Alcaloides.

Este tipo de prueba de identificación tiende a que la muestra se evapore hasta la sequedad, si se llega a detectar olor de amoníaco, se puede determinar la presencia de alcaloides. Cuando la muestra se seca, se le agrega HCl y se agita con un solvente inmiscible y se separa. La fase acuosa se alcaliniza y se extrae y por último se analizan las tres fases por separado (Marcano, 2000, p.32).

Saponinas y esteroides.

La muestra vegetal se hidroliza, se concentra y se extrae con acetato de etilo o bien con cloroformo. La fase orgánica es la que debe poseer las saponinas al agregarle el reactivo de Liebermann- Burchard, este debe producir un cambio de coloración azul o violeta (Marcano, 2000, p.32).

Flavonoides.

En este el material vegetal se lleva a sequedad y se desgrasa con éter de petróleo, luego se trata con HCl concentrado y se espera una coloración roja al dejar en reposo la reacción al menos de unos 10 – 20 minutos (Marcano, 2000, p.32).

Taninos y polifenoles.

Se debe evaporar la muestra del extracto y se le agrega agua, por último, se le agrega cloruro férrico, esto produce una coloración marrón; esta es la prueba positiva a la presencia de taninos y polifenoles (Marcano, 2000, p.32).

Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja ha llegado a ser una de las técnicas más importantes para la determinación de la estructura molecular. Al mismo tiempo, sus aplicaciones de tipo analítico la han convertido en una herramienta indispensable en el laboratorio químico.

Skoog (2015) enfatiza los extractos IR de las sustancias químicas como instrumentos para la determinación de la identidad de un compuesto, donde la región comprendida entre los 3600cm^{-1} a 1250cm^{-1} son utilizados para la identificación de grupos funcionales comunes, y la región que se encuentra entre los 1200cm^{-1} a 600cm^{-1} es conocida como “huella dactilar”, donde pequeñas diferencias en la estructura y la constitución de las moléculas dan lugar a cambios significativos en el espectro IR (p. 573).

Existen a nivel mundial tablas, donde se enlistan valores más específicos de las longitudes de onda para cada grupo funcional, principalmente de especies orgánicas. Es importante tener claro que el grado de pureza de la muestra, la concentración y el equipo puede incurrir en las señales obtenidas a nivel experimental (Skoog, 2015).

Tabla 9. Frecuencia Cercana a la que se Encuentran Grupos Funcionales en un Espectro Infrarrojo

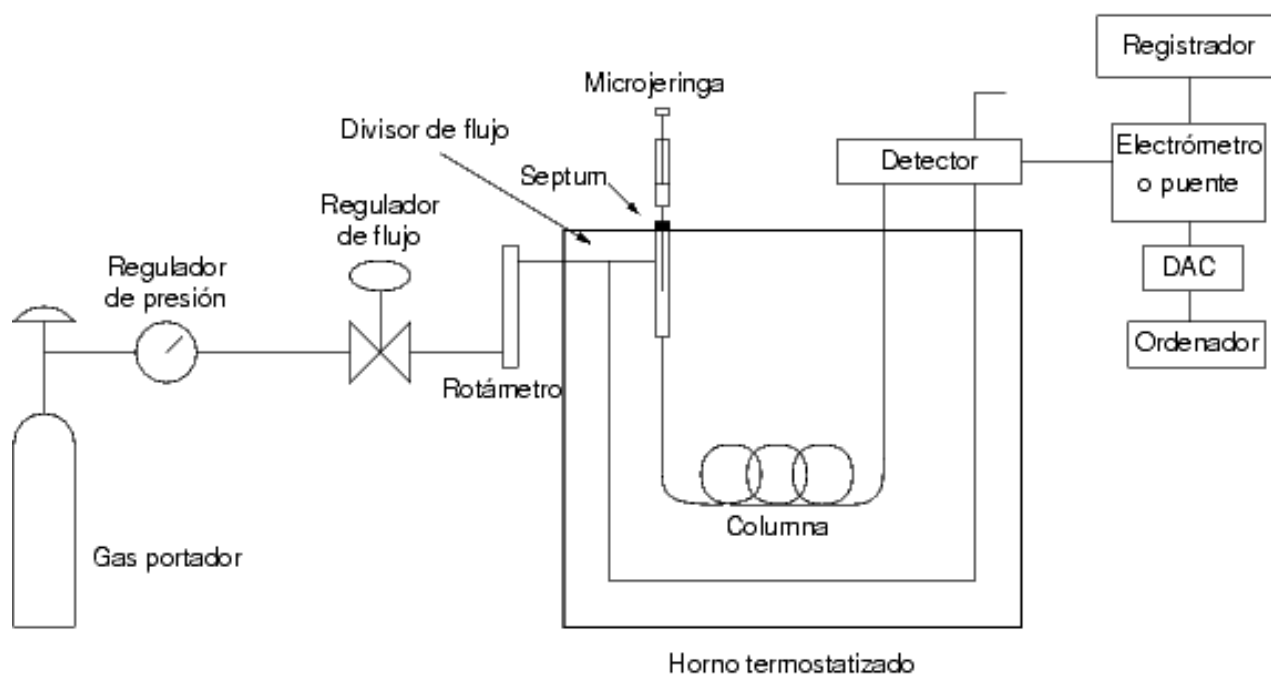
| Grupo funcional | Tipo de vibración | Frecuencia (cm-1) |
|-----------------|--|-------------------|
| C-H | Alcanos (estiramiento) | 3000-2850 |
| | CH ₃ (flexión) | 1450-1375 |
| | CH ₂ (flexión) | 1465 |
| | Alquenos (estiramiento) | 3100-3000 |
| | Aromáticos (estiramiento) | 3150-3050 |
| | Aldehído | 2900-2800 |
| C=C | Alqueno | 1680-1600 |
| | Aromático | 1600-1475 |
| C≡C | Alquino | 2250-2100 |
| C=O | Aldehído | 1740-1720 |
| | Cetona | 1725-1705 |
| | Ácido carboxílico | 1725-1700 |
| | Ester | 1750-1730 |
| O-H | Alcohol, Fenoles | 3650-3200 |
| | Ácido carboxílico | 3400-2400 |
| N-H | Aminas primarias y secundarias, amidas | 3500-1550 |
| C-N | Aminas | 1350-1000 |
| N=O | Nitro | 1550-1350 |

Análisis cromatografía de gases

Según Marqués (2015), la cromatografía de gases es una de las técnicas más versátiles y ubicuas en los laboratorios, y se usa mucho en la determinación de compuestos orgánicos. Con esta técnica se pueden separar mezclas muy complejas (p.17).

En cromatografía de gases, la muestra pasa al estado de vapor inyectándola a un puerto calentado, y el eluyente es un gas. El factor más importante en la cromatografía de gases es la selección de la columna adecuada (fase estacionaria) para la separación particular sobre la que se desea experimentar (p.17).

Figura 20. Diagrama de un Cromatógrafo de Gases



Nota: Marqués (2015)

Formas Farmacéuticas

Según la USP (2015), las formas farmacéuticas se definen como la combinación de uno o más fármacos y/o excipientes para poder facilitar la dosificación y administración del medicamento en un paciente determinado (p.1398).

Por otro lado, en cuanto al diseño, materiales y análisis al que se someten las diferentes formas farmacéuticas, estos se toman en cuenta en la calidad de cada producto, por lo que se deben considerar desde las propiedades físicas, químicas, biológicas y hasta las vías de administración que se utilizaran (USP, 2015, p.1398).

Formas farmacéuticas semisólidas

Este tipo de formas reúne todos los sistemas farmacéuticos en su formulación, es decir, utilizan materias primas tanto sólidas como líquidas. Dentro de estas se encuentran la descripción a continuación (USP, 2015).

Tabla 10. Tipos de Formas Farmacéuticas Semisólidas

| Tipos | Características | Vía de administración |
|-------------------------|--|------------------------------|
| <i>Crema</i> | Emulsión que a menudo contiene más de un 20 % de agua y sustancias volátiles y/o menos de 50 % de hidrocarburos, ceras o polioles como vehículos para el fármaco. | Tópica Mucosas |
| <i>Ungüentos</i> | Preparaciones destinadas para la aplicación externa sobre la piel o membranas de mucosas. | Local Sistémica |
| <i>Geles</i> | Suspensiones de partículas inorgánicas pequeñas o de moléculas orgánicas Interpenetradas por un líquido. Estos pueden clasificarse como sistemas de una fase o sistemas de dos fases | Tópica Mucosa |
| <i>Pastas</i> | Preparaciones de consistencia firme que contienen un alto porcentaje y solidos finamente dispersos. Estas no fluyen a temperatura corporal. | Local Mucosa |

Nota: Autor

Vía de administración tópica

Esta vía se define como la aplicación directa de los fármacos sobre la piel y las mucosas en los orificios, de manera que su fin sea ejercer un efecto local sobre el sitio de aplicación.

Como lo refiere Doménech, Martínez y Delfina (2007), quienes indican que aquellos fármacos que hagan contacto con órganos o bien tejidos sobre los que debe haber un efecto terapéutico, deben atravesar la piel o las mucosas, ya sea por una forma directa o indirecta.

La administración tópica es el medio por el cual se aplica un medicamento semisólido o líquido, directamente a mucosas o a piel. La absorción se da mediante vasos sanguíneos localizados en estas zonas descritas, que van a permitir una rápida acción local. Dentro de este tipo de aplicación se encuentran la cutánea, transdérmica, oftálmica, ótica y nasal (Martin, 2018, párr. 1-3).

De acuerdo con lo citado por Ferradis (2013), la vía cutánea permite que un medicamento actúe a nivel local. Sin embargo, dependiendo de la afectación y la zona de la lesión en el tejido de la piel puede darse una acción sistémica, por tanto, se debe tener cuidado al momento de hacer una prescripción o recomendación a ese tipo de vía de administración, ya que un determinado medicamento a través de esta vía puede provocar efectos no deseados si ingresa al torrente circulatorio (pp. 58-59).

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

En el siguiente capítulo se describirá lo referente a los procedimientos para llevar a cabo el estudio experimental en el laboratorio y el análisis de resultados principales para el cumplimiento de los objetivos y dar respuesta a la interrogante expuesta en el planteamiento del problema.

Enfoque

El enfoque de la presente investigación es de tipo cuantitativo, debido a la utilización de diversas variables que logran ser medibles a determinado tiempo. Así mismo, se diseñará un instrumento para recolectar datos, los cuales son traducidos en datos numéricos, tabulados, generando resultados con la aplicación de una herramienta estadística, e interpretados con el fin de resolver el problema planteado. Hernández, Fernández y Baptista, (2014, p.4) definen este enfoque como “la recolección de datos para probar hipótesis con base en la medición numérica y el análisis estadístico, con el fin establecer pautas de comportamiento y probar teorías”. Ya que el presente estudio pretende comprobar de forma experimental el resultado antimicrobiano que se obtiene al colocar el extracto de la broza del café sobre agentes patógenos como *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Método

El método de la investigación es de tipo experimental, ya que como lo afirman Hernández et al. (2014) “La esencia de esta concepción de experimento es que requiere la manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles resultados” (p.129). Este trabajo requiere la selección de un método para obtener el extracto de una planta, para analizarlo frente a diversos microorganismos y determinar si posee actividad antimicrobiana.

Las placas con el agar y las cepas del microorganismo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha prueba se hará en el Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica.

Objetos de Estudio

A continuación, se detallan los recursos fundamentales con los cuales se llevó a cabo la parte experimental del trabajo de investigación.

- 1- Broza del café, variedad Caturra y Catuaí en Costa Rica
- 2- Equipo Soxhlet
- 3- Equipo de arrastre por vapor
- 4- Equipo Rotavapor Yamato BM500
- 5- Cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- 6- Medio de cultivo Tioglicolato
- 7- Espectro Infrarrojo
- 8- Cromatografía de Gases
- 9- Placas Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana
- 10- Concentraciones del extracto
- 11- Resultados del extracto de *Coffea arábica*

La parte experimental del trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad Internacional de las Américas, San José, Costa Rica; en donde se obtuvo el extracto de la planta, también se ensayó su efecto sobre los agentes patógenos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en las instalaciones del Laboratorio Microbiológico del Hospital Nacional de Niños, esto para lograr cumplir con los objetivos planteados en el proyecto de investigación.

Instrumentos y técnicas de recolección.

En el apartado que se presentará a continuación se mencionarán los recursos necesarios para desarrollar el proyecto de investigación, los cuales incluyen equipo y cristalería que se deberá utilizar.

Obtención del extracto del *Coffea arábica*

La broza del café utilizada para la extracción se obtuvo del Micro beneficio COOPEDOTA, Santa María Dota en el mes de diciembre 2017, ya que es la época de su procesamiento.

Para realizar una adecuada extracción del extracto de la broza del café es importante conocer los materiales y reactivos que se requieren para desarrollar los procedimientos, por lo cual cada instrumento necesario para la obtención del extracto se menciona en la siguiente lista:

Material y Equipo.

Balanza granataria Ballar WTB 2000

Broza del café, variedad Caturra y Catuaí.

Beaker de 250 mL

Guantes de látex

Equipo Soxhlet

Equipo de arrastre por vapor

Beaker de 400 mL

Beaker de 100 mL

Beaker de 500 mL

Calentador-agitador Corning PC-420D

Pastillas de agitación magnética

Termómetros

Rotavapor Yamato MB500

Reactivos.

Agua destilada

Etanol al 96%

Cloruro Férrico al 20 %

Gelatina y Sal (Cloruro de Sodio)

Acetato de Plomo II al 10 %

Pruebas de identificación

Para determinar la presencia de los principales metabolitos activos del extracto de la broza del *Coffea arábica* se requiere de diversas pruebas que ante la presencia de un compuesto cambian de color al agregar determinado reactivo.

Materiales y Equipo

Tubos de ensayo

Goteros

Gradilla

Probeta 10 mL

Reactivos

Extracto de broza del *Coffea arábica*, variedad Caturra y Catuaí

Etanol al 96 %

Cloruro Férrico al 20 %

Reactivo de Gelatina y Sal (Cloruro de Sodio)

Acetato de plomo II al 10 %

Preparación de microdiluciones de la broza del *Coffea arábica*.

Material y Equipo

Extracto de broza del café

Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Guantes de látex

Tubos de ensayo

Incubadora EQ-019. Selecta P.

Placas plásticas estériles de 96 pocillos

Reactivos

Caldo de Tioglicolato

Solución Salina de Mc Farland al 0,5 %

Procedimiento de recolección y análisis de datos

El proceso de recolección y análisis de los datos de la investigación se realiza en los laboratorios de química de la Universidad Internacional de las Américas (UIA) y en el Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica, durante el segundo y tercer cuatrimestre del 2018.

A continuación, se describirá el procedimiento a seguir, el cual se dividirá en diferentes fases, con el objetivo de lograr un orden lógico y adecuado, de manera que pueda permitir una mejor comprensión de la metodología empleada.

Recolección y almacenamiento de la materia prima vegetal

La recolección de la broza del *Coffea arábica* (café) se realizó durante el mes de noviembre y diciembre del 2017. Para la extracción de la materia prima se siguió el siguiente procedimiento:

Obtención del extracto de la broza del café

Extracción Soxhlet.

Se armó el equipo de Soxhlet mostrado en la figura 21. La materia prima vegetal se colocó en un mortero para poder triturar en trozos más pequeños, posterior a esto, con la ayuda de un beaker de 250 mL, se pesó en una balanza granataria 30 g de broza del café, como se muestra en la figura 22. Una vez pesada la broza, se introdujo el cartucho del Soxhlet, se le colocó un filtro para coffee maker. Inmediatamente, se colocó un soporte universal, posicionando el calentador y agitador de manera vertical y asegurándose que se colocara el balón de fondo plano de 500 mL que contenía 250 mL de alcohol etílico al 96 %.

La materia vegetal y el condensador se colocaron en posición de reflujo y se ajustaron mangueras de entrada y salida al condensador; la de entrada estuvo conectada a una bomba de inmersión sumergida en un baño de agua-hielo dentro de una hielera pequeña, la de salida se sumergió en la misma hielera, esto para poder mantener un ahorro del agua.

Figura 21. Equipo Soxhlet



Figura 22. Peso de la Broza del Café



Se calentó a una temperatura de 315 °C de manera que se verificaró que el solvente no se volatilizara con ayuda de un termómetro, para efectuar la extracción por un espacio de 7 horas. Una vez que se terminó la extracción, se trasvasó el extracto contenido en el balón de fondo plano de 500 mL del Soxhlet, con ayuda de un embudo de espiga, al balón de fondo redondo de 500 mL del equipo de rotavapor y se eliminó el etanol calentando a una temperatura de 80°C.

En el momento que se puso en el rotavapor se dejó que destilara el disolvente hasta que se llegó a observar que ya no destilaba y no caía más etanol en el balón recolector, después se detuvo el equipo de rotavapor, como se observa en la Figura 23.

Seguidamente, se trasvasó el aceite, con ayuda de una pipeta graduada hacia una probeta de 20 mL para medir el volumen obtenido. Posterior a la medida, se trasladó el extracto de la probeta a un envase transparente, protegiéndolo de la luz con papel aluminio.

Finalmente, se determinó el porcentaje de rendimiento alcanzado por el método de Soxhlet, utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Rendimiento Experimental en el Método Soxhlet

$$\text{Rendimiento de extracción} = \frac{\text{g obtenidos al final del proceso}}{\text{g de la broza colocadas en el Soxhlet}} \times 100$$

Figura 23. Equipo Rotavapor Yamato BM500



Extracción arrastre por vapor.

Se realizó un montaje del equipo arrastre por vapor, como se muestra en la figura 24. Dentro de un beaker de 25 mL se pesó 50 g de broza del café sobre una balanza granataria. Luego, se colocó la broza del café en un balón de tres bocas de 500 mL junto con 10 mL de agua destilada; adicionalmente, en un balón de fondo plano de 500 mL se agregó 300 mL de agua destilada. Con ayuda de un soporte universal, se colocó el calentador- agitador y en forma horizontal se armó el equipo por arrastre de vapor.

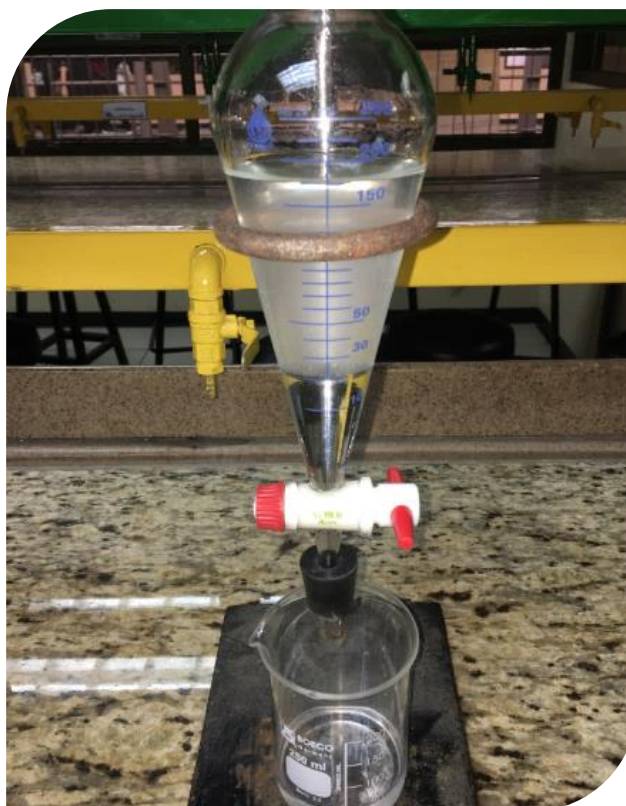
Como se observa en la figura 24, el balón de fondo plano de 500 mL se conectó por medio de una manguera, que contenía en ambos extremos un tapón para las bocas de los balones, al balón de tres bocas que contenía la broza del café. El condensador se incorporó a la tercera boca del balón con la materia vegetal, y se conectó al condensador la manguera de entrada de agua conectada a la bomba de flujo sumergida en agua hielo, dentro de una hielera, y la manguera de la posición de salida del refrigerante dentro de la misma manguera.

Figura 24. Equipo Arrastre por Vapor



Posteriormente, la muestra fue recogida en un beaker, se le agregó sulfato de sodio anhidro, se mezcló y se decantó por gravedad. Se le realizaron extracciones con diclorometano al extracto de la broza de café sin ningún otro compuesto, como se puede observar en la figura 25. Finalmente, se expuso la mezcla obtenida a una separación por medio del rotavapor para eliminar por completo algún otro componente que haya quedado, por último, se trasvasó el aceite obtenido a un envase limpio y seco para su posterior análisis.

Figura 25. Eliminación de Agua a la Broza del Café



Finalmente, se determinó el porcentaje de rendimiento alcanzado por el método arrastre por vapor a través de la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Rendimiento Experimental de Método Arrastre por Vapor.

$$\text{Rendimiento de extracción} = \frac{\text{g obtenidos al final del proceso}}{\text{g de la broza colocadas en el arrastre por vapor}} \times 100$$

Caracterización y cuantificación de los componentes de la broza del *Coffea arábica*

Para determinar componentes activos del extracto vegetal obtenido, se procedió a realizar pruebas de identificación para fenoles, utilizando los reactivos mostrados en la figura 26.

Figura 26. Reactivos para la Prueba de Identificación



Identificación de Fenoles.

Prueba de Cloruro Férrico ($FeCl_3$) al 10 %.

Se agregó 1 mL del extracto de broza del café en un tubo de ensayo con 1 mL de Cloruro férrico $FeCl_3$.

Prueba de Gelatina- sal.

Se agregó 1 mL de la muestra del extracto de broza del café en un tubo de ensayo, y 1 mL de la solución gelatina-sal.

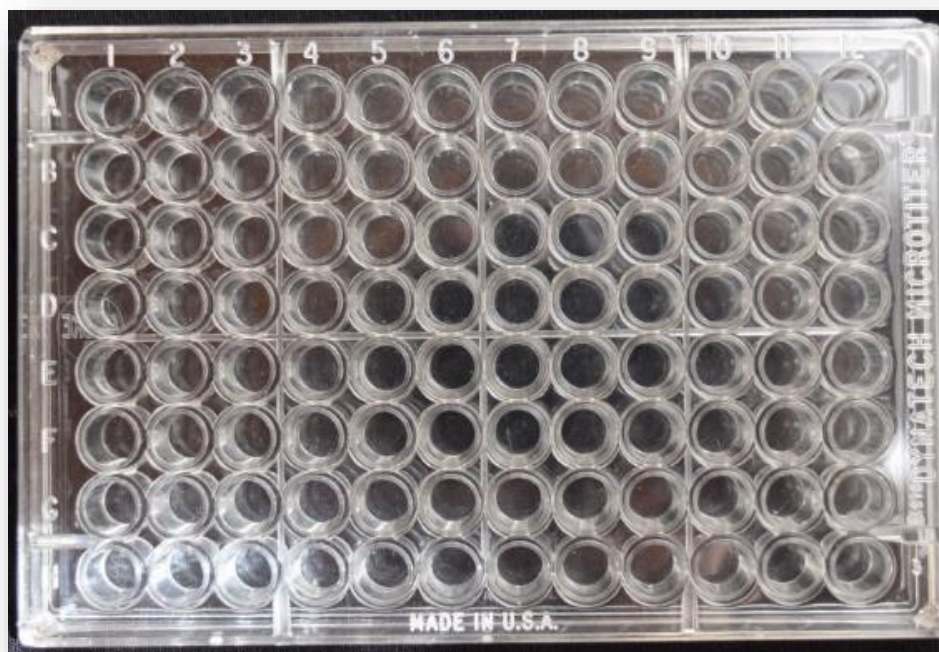
Prueba de acetato de plomo $Pb(C_2H_3O_2)_2$ al 10 %.

En un tubo de ensayo se agregó 1 mL de la muestra del extracto de la broza del café y se adiciono 1 mL de acetato de plomo II al 10 %.

Preparación para la prueba de sensibilidad antimicrobiana mediante microtitulación.

Se procedió a realizar el montaje de una concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la técnica de la microtitulación, utilizando una placa plástica, estéril, con tapa, de 96 pozos y un fondo en U, donde se encontraba rotulado horizontalmente del pozo 1 al 12 y verticalmente del pozo A al H (Figura 27). Una vez verificadas las posiciones, se colocó 50 μ L del medio de cultivo en cada uno de los pozos de la placa a emplear del 1-10, exceptuando el pozo 11-12.

Figura 27. Placa Estéril para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana (PSA)

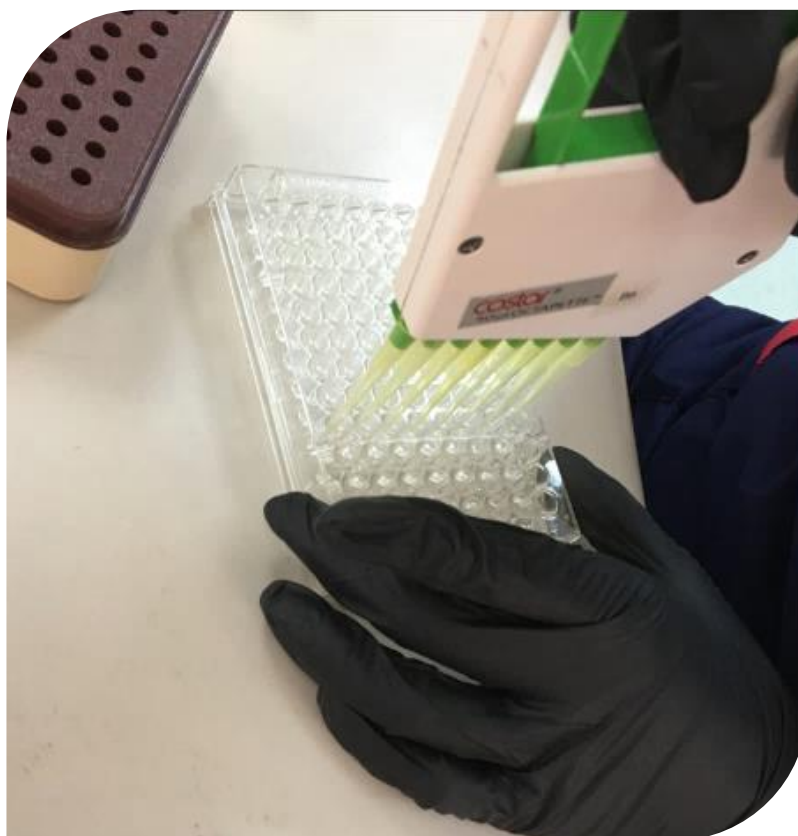


Se colocaron 50 μL del extracto de la broza del café, simulándose como concentración madre de un antibiótico. Se realizó una dilución 1:2, por lo que la concentración del extracto como solución madre fue de 301,2 g/mL, para el primer pozo se tuvo una concentración real de 150.6 g/mL, luego se procedió a realizar diluciones dobles hasta los pozos 10 (tabla 11), dejando el pozo 11 como control de crecimiento negativo y al pozo 12 de control positivo de crecimiento, es decir, el control positivo tuvo medio de cultivo más el inóculo bacteriano y el control negativo tuvo medio de cultivo y antibiótico (extracto de la broza del café), para un volumen final de 100 μL en ambos pozos.

Tabla 11. Diluciones a partir del extracto de la broza del café

| Concentración del extracto puro de la broza del café: 301,2 g/mL | | |
|--|-----------------|--------------------|
| Número de pozo | Dilución | Concentración g/mL |
| Pozo 1 | Dilución 1:2 | 150,6 |
| Pozo 2 | Dilución 1:4 | 75,3 |
| Pozo 3 | Dilución 1:8 | 37,7 |
| Pozo 4 | Dilución 1:16 | 18,8 |
| Pozo 5 | Dilución 1:32 | 9,4 |
| Pozo 6 | Dilución 1:64 | 4,7 |
| Pozo 7 | Dilución 1:128 | 2,4 |
| Pozo 8 | Dilución 1:256 | 1,1 |
| Pozo 9 | Dilución 1:512 | 0,6 |
| Pozo 10 | Dilución 1:1024 | 0,3 |

Figura 28. Diluciones Dobles del Extracto



Una vez realizadas las diluciones seriadas dobles, en los pozos de 1 a 10 (con excepción de pozos 11 y 12), se colocó 50 μ L del extracto de broza de café en el primer pozo y se realizaron diluciones dobles hasta el pozo 10, del cual se eliminó 50 μ L, para un volumen de 50 μ L en cada pozo. Continuamente, se colocaron 50 μ L del inóculo bacteriano estandarizado en medio Mcfarland, a cada pozo de la placa estéril, bajo condiciones de turbidez, pureza y crecimiento, por lo que se tomaron cepas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*. Para esta parte del procedimiento se asignaron en los pozos A-B para *S. aureus*, pozo C-D para *E. coli* y el pozo E-F para *P. aeruginosa* (Figura 24).

Figura 29. Inóculo Bacteriano Estandarizado en Medio McFarland



Una vez lista la placa, se incuba a 35 °C por 24 horas, con la tapa de la placa protegiéndola de su permeabilidad al oxígeno, además de evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incubaron. (Figura. 30).

Figura 30. Incubación Bajo Condiciones Adecuadas por 24 horas



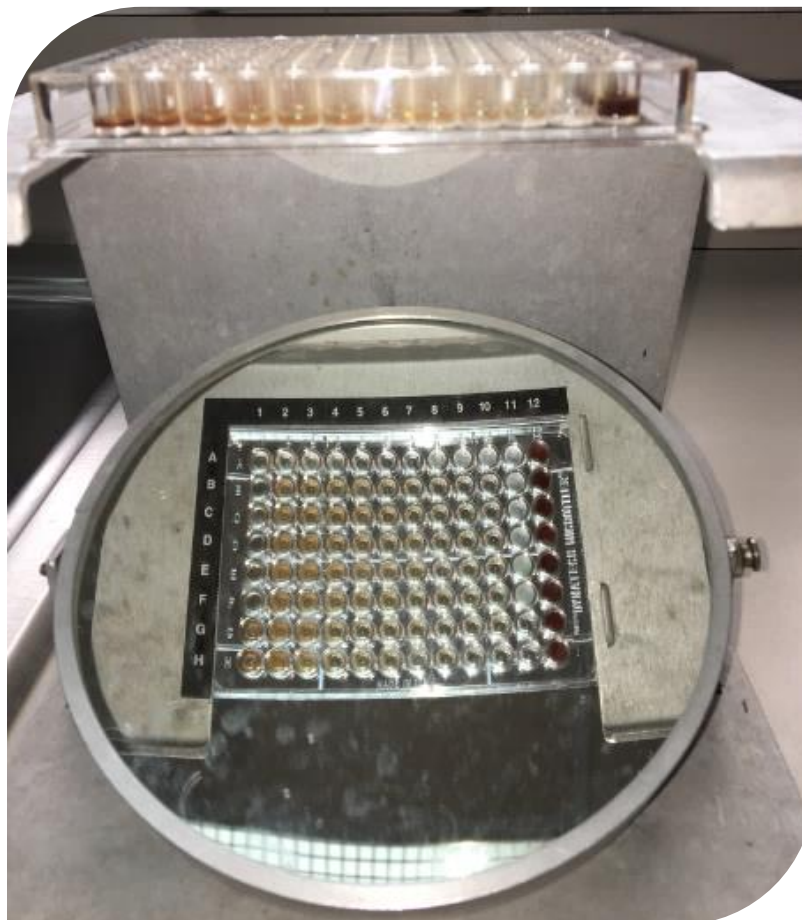
Finalmente, después del período de incubación, se realizó la interpretación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y se determinó observándose en cuál pozo no hubo crecimiento bacteriano, usando como referencia el control positivo (Figura 31).

Figura 31. Control Positivo y Negativo (11-12)



La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue la concentración del último pozo, en el cual no hubo crecimiento microbiano, esta observación para la interpretación de resultados se realizó mediante un lector con espejo, en el que refleja la parte inferior de la placa de microtitulación (Figura 32).

Figura 32. Interpretación a través del Lector con Espejo.



Nota: Autor

Determinación de la propiedad bactericida de la broza del café

Para la determinación de la concentración mínima bactericida o bacteriostática (CMB), se extrajeron 10 μL de la placa utilizada PSA y se inocularon en el medio de cultivo agar sangre, donde se incubaron por 24 horas para determinar la cantidad de colonias que crecieron.

Elaboración de la crema antimicrobiana

Tabla 12. Formulación de la crema

| Reactivo | % de reactivo utilizado para la elaboración de 75 g de crema | Fase a la que pertenece |
|-----------------------------------|---|--------------------------------|
| Alcohol cetílico | 2 % | Fase acuosa |
| Acido esteárico | 7 % | Fase acuosa |
| <i>Butilhidroxitolueno</i> (BHT) | 0,02 % | Fase acuosa |
| Glicerina | 10 % | Fase oleosa |
| Metilparabenos | 0,15 % | Fase oleosa |
| Propilparabenos | 0,05 % | Fase acuosa |
| Aceite mineral | 20 % | Fase acuosa |
| Trietanolamina | 2 % | Fase oleosa |
| Extracto de <i>Coffea arábica</i> | 5 % | |
| Agua destilada c.s.p. | 53,78 % | |

Se dispensó cada uno de los reactivos de la fase I (fase acuosa) y la fase II (fase oleosa), una vez dispensada la materia prima se fundió de la fase I el ácido esteárico y el alcohol cetílico a una temperatura de 70 °C en un beaker sobre un calentador, se procedió a adicionar el aceite

mineral para poder disolver el propilparabeno y se continuó calentando hasta una temperatura de 75 °C, mezclando con una agitación constante por medio de la pastilla de agitación por 35 minutos.

En otro beaker se añadió el agua destilada, glicerina y la trietanolamina a una temperatura de 80 °C, se disolvió el metilparabeno a estos componentes, manteniendo la temperatura la temperatura a 80 °C mezclando con agitación constante y por un tiempo de 30 minutos aproximadamente.

Una vez lista la fase acuosa y la fase oleosa en agitación constante, se mezcló ambas fases por un tiempo de 30 minutos, se disminuyó a una temperatura entre 40 °C y 45 °C y se fue adicionando el extracto de la broza de *Coffea arábica* manteniendo la agitación de manera constante.

Finalmente, se trasvasó la crema a su empaque primario, utilizando un tubo de metal de 75 g, con el fin de proteger la formulación.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos, se ordena y se estructura toda la información obtenida durante la elaboración del proyecto. Además, se analizan los elementos y datos alcanzados en función de cada una de las variables planeadas. También se desea orientar la interpretación de la información obtenida, facilitando el cruzamiento de los datos y, además, contribuyendo al alcance de los objetivos de la investigación. Finalmente, se desea demostrar el valor científico de la información recopilada y confirmar la teoría sobre las propiedades antimicrobianas de la especie vegetal analizada.

Obtención del extracto de la broza del café

Inicialmente, la broza del *Coffea arábica* se adquirió en el beneficio de COOPEDOTA, Santa María de Dota, San José en el mes de noviembre y diciembre del 2017, ya que en Costa Rica la cosecha de producción es en el último trimestre de cada año.

Se seleccionó la broza de café, que fue una broza microlote, este tipo es un perfil triple A, es decir, el café y la broza, presenta una calidad máxima, con condiciones de maduración óptimas al momento de recolección de la fruta, además de variedades permitidas, de tal manera que no afecte la calidad. Cabe destacar que las condiciones a las que se somete la broza microlote, entre otras, se ubica sobre una altura de 1550 metros sobre el nivel del mar, debemos tomar en cuenta que la altura a la que se encuentra interviene en la calidad del producto, ya que se fundamenta que este tipo de maduración es consecuencia de esta.

La forma de almacenamiento que se dio de la broza fue en una bolsa hermética, a una temperatura de entre 25 y 30 °C, a una altura de 20 cm sobre el suelo, para esto se utilizó una tarima de metal con el fin de que no adquiriera humedad y se mantuviera en condiciones favorables.

La recolección de la broza del *Coffea arábica* fue de aproximadamente 6 kilogramos. Para la extracción se emplearon dos métodos de extracción con diferentes solventes para cada uno,

previo a las extracciones, se seleccionó la broza del café en condiciones aptas de almacenamiento y se trituró para poder obtener trozos más pequeños y poder alcanzar una gran cantidad de muestra, tal como se muestra en la figura 33.

Figura 33. Broza de *Coffea arábica* Triturado para las Extracciones



Con el objetivo de evaluar el mejor proceso para la extracción del *Coffea arábica*, se evaluaron las técnicas por el método Soxhlet con etanol como disolvente y en arrastre por vapor. En ambos casos se emplearon cantidades diferentes de la materia vegetal. Los resultados de esta evaluación se mostraron en la tabla 13.

Tabla 13. Porcentajes de Extracción Resultantes de las Dos Técnicas Evaluadas en la Obtención del Extracto (*Coffea arábica*)

| Método de extracción | Masa inicial de materia vegetal (g) | Masa de extracto extraído (g) | Porcentaje de extracción (%) |
|-----------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Soxhlet | 30 | 14,05 | 47 |
| Arrastre por vapor | 50 | 13, 05 | 29 |

Para la selección del solvente se efectuó un análisis previo, de acuerdo con el trabajo de Calle y Mendoza (2017), se realizó la extracción del aceite de la broza del café utilizando solventes como agua, metanol, hexano y etanol. Estos concluyeron que el etanol al 96% es el solvente adecuado, pues es de fácil manejo, menos tóxico, no presenta reacciones indeseadas al momento de la extracción, y produce un mayor rendimiento en la extracción.

Se colocaron, aproximadamente 30 g de la broza del café en el equipo Soxhlet para cada extracción realizada en el laboratorio, la cual fue la cantidad que se ajustaba al equipo empleado. La extracción se realizó por triplicado con el fin de obtener cantidades suficientes de extracto vegetal. Cabe destacar que, con la extracción con etanol se logró apreciar una tonalidad más café conforme el proceso se iba realizando.

En la obtención del extracto por este método se utilizó como solvente el alcohol etílico al 96 %, a una temperatura superior al punto de ebullición del solvente hasta obtener de 4 a 5 vueltas, es decir, cuando el solvente con el extracto fluye de vuelta al balón con un tiempo de duración de 6 horas.

Posterior a este tiempo y con ayuda de un embudo de espiga, se trasvasó el contenido de extracto alcohólico a un balón de fondo redondo y el disolvente se eliminó por destilación reducida mediante el uso de un rotavapor. Este equipo consiste en la evaporación mediante una combinación

de temperatura suministrada por un baño de calentamiento y una generación de presión al vacío, el procedimiento se mantuvo a una temperatura constante de 80 °C para confirmar una completa evaporación del etanol (Carrión y García, 2010).

A la hora de utilizar el rotavapor se pudo notar que, al quedar poca cantidad del extracto oleoso en el balón, este se debió extraer del balón rápidamente, ya que, se solidifica de inmediato sin la aplicación de calor, se trasvaso a una probeta de 20 mL y posterior a la medición se guardó en un vial color ámbar con el fin de darle protección de la luz.

Figura 34. Extractos de Broza de Café Obtenidos con el Equipo Soxhlet utilizando etanol al 96%



Una vez concentrado el extracto obtenido a partir del solvente etanol, se procedió a calcular el porcentaje de rendimiento de la siguiente manera:

Ecuación 3. Rendimiento Obtenido en el Método Soxhlet.

$$\text{Rendimiento de extracción} = \frac{14,05 \text{ g de extracto}}{30 \text{ g de broza de café en equipo Soxhlet}} \times 100$$

Rendimiento de extracción: 47 %

Tabla 14. Características Organolépticas del Extracto Obtenido

| Característica organoléptica | Resultado obtenido |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| Apariencia | Café oscuro |
| Aroma | Característico a la broza de café. |
| Consistencia | Viscosa al tacto |

El otro método utilizado para la extracción de la broza del *Coffea arábica* fue a través de una destilación de arrastre por vapor. Se utilizó una muestra de aproximadamente 45 g de la broza triturada con la ayuda de un mortero, colocado en un balón de 500 mL y el agua del condensador bajo una temperatura de 15 °C. El proceso tuvo una duración aproximada de 7 horas. El destilado se almacenó en un Erlenmeyer de 250 mL, como se observa en la figura 35.

Figura 35. Obtención del Extracto de Broza de *Coffea arabica* por el Método Arrastre por Vapor



Es importante resaltar que este método de extracción es una manera fácil, efectiva y segura de obtener un extracto vegetal, debido a que el agua y el extracto son insolubles, lo que facilita su separación, ya que el producto que va a ser destilado (volátil) formará dos fases al condensarse, por lo que permitirá la separación del producto y el agua de una manera fácil (Peredo, 2009).

Una vez obtenido el destilado, se procedió a la separación de las dos fases, la acuosa y el extracto. Esto se realizó, en primera instancia, con la saturación de la fase acuosa con cloruro de sodio sólido, este procedimiento favoreció la separación del extracto que se encontraba disperso en el agua. Seguido de esto, se le adicionó diclorometano, medio en el que se disolvería el extracto de la broza y se separó por decantación, este procedimiento se realizó dos ocasiones más.

La parte parcialmente soluble en agua se puede separar totalmente con la adición de una sal, la cual deja finalmente dos fases. Por tanto, la fase no soluble se decanta y después se puede destilar para luego hacer su fraccionamiento y caracterización. (Cano, Godínez, Chávez y Barrientos, 2001, p.17)

Finalmente, a la mezcla obtenida del rotavapor se trasvasó el extracto obtenido sin disolvente, a un envase limpio. El obtenido del extracto fue de 1,5 mL para una masa de 13,05 g de extracto y un rendimiento de extracción de 29 %.

Figura 36. Obtención del Extracto de Broza de *Coffea arábica* por el Método Arrastre por Vapor



Una vez alcanzado el extracto obtenido a partir del solvente agua, se procedió a obtener el rendimiento que fue calculado de la siguiente manera:

Ecuación 4. Rendimiento Obtenido del Método Arrastre por Vapor.

$$\text{Rendimiento de extracción} = \frac{13,05 \text{ g de extracto}}{45 \text{ g de broza de café en el arrastre por vapor}} \times 100$$

Rendimiento de extracción: 29 %

Debido a la baja cantidad obtenida por este método de extracción, el extracto resultante fue utilizado únicamente para realizar las pruebas microbiológicas. Por esta razón, se descartó la posibilidad de realizar las pruebas de identificación, ya que para llevar a cabo la caracterización química se necesita de 1 mL para cada una de estas.

Tabla 15. Características Organolépticas del Extracto Obtenido

| Característica organoléptica | Resultado obtenido |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| Apariencia | Transparente |
| Aroma | Característico a la broza de café. |
| Consistencia | Viscosa al tacto |

Caracterización y cuantificación de los compuestos de la broza del *Coffea arábica* a través de pruebas de identificación

La determinación de los componentes activos del extracto de broza de *Coffea arábica* por el método de extracción Soxhlet, se llevó a cabo por medio de pruebas de identificación a través de una serie de reacciones químicas de coloración y de precipitación. En este caso las pruebas de caracterización se realizaron con el objetivo de evidenciar la presencia de taninos, la clase de taninos existentes en el extracto de la broza de café y la identificación de polifenoles. Para ello se realizaron tres pruebas: acetato de plomo (II) al 10 %, gelatina- sal y cloruro férrico al 10 %.

Tabla 16. Resultados de las Pruebas de Caracterización del Extracto de *Coffea arábica* Obtenido por el Método Soxhlet

| Prueba de identificación | Resultados | Observaciones |
|--------------------------|------------|-------------------------------------|
| Acetato de plomo al 10 % | Negativa | No hubo formación de un precipitado |
| Gelatina- sal | Negativa | No hubo formación de precipitado |
| Cloruro férrico al 10 % | Positiva | Coloración verde |

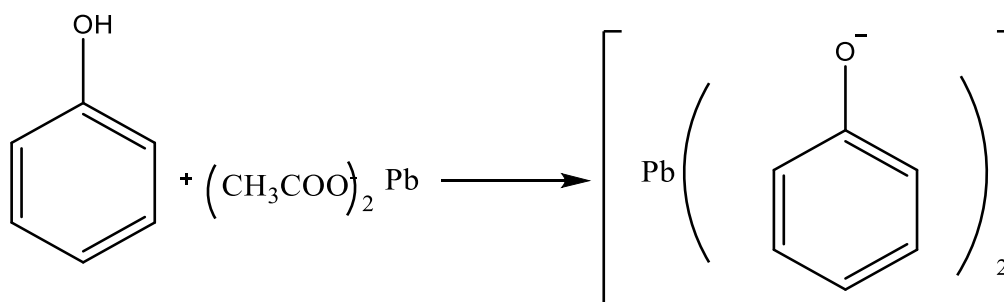
Figura 37. Resultados de la Prueba de Acetato de Plomo al 10 %



Figura 38. Prueba del Blanco con Etanol y Acetato de Plomo al 10 %



Figura 39. Reacción de Tanino con Acetato de Plomo (II)



Como se observa en la tabla 12, para la prueba de acetato de plomo (II) al 10 % en la identificación de fenoles, esta resultó positiva. Se observó un precipitado blanco, como se muestra en la figura 37. La prueba con acetato de plomo se fundamenta en una reacción de precipitación, y se aplica únicamente para el reconocimiento de taninos hidrolizables, por lo que al formarse un precipitado blanco se indican resultados positivos para los taninos. El acetato de plomo precipita los taninos como sales de plomo, por lo que puede ser usado como método de extracción y de separación (Domínguez, 2011, p.100).

Figura 40. Resultados de la Prueba Gelatina- Sal



Figura 41. Prueba del Blanco con Etanol y Gelatina y Sal



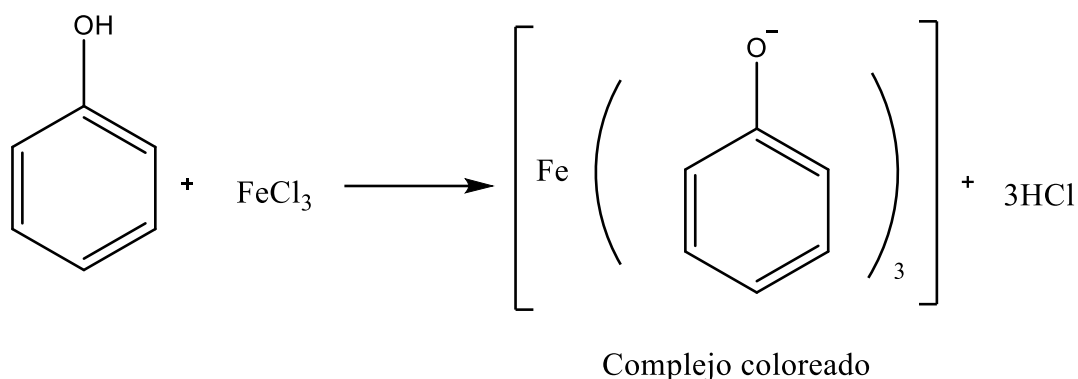
La prueba gelatina- sal para la identificación de fenoles resultó negativa. No se observó la formación de un precipitado, lo cual indica la presencia de taninos hidrolizables como se observa en la figura 38. El reactivo gelatina- sal consiste en una solución saturada de cloruro de sodio en agua, acompañada con gelatina neutra, provocando la hidrólisis en los taninos hidrolizables, ayudando a la precipitación e indicando presencia de taninos (Domínguez, 2011, p.101).

Figura 42. Resultados de la Prueba de Cloruro Férrico al 10%



Figura 43. Prueba del Blanco con Etanol y Cloruro Férrico al 10 %



Figura 44. Reacción de Tanino con Cloruro Férrico

Para la prueba de cloruro férrico al 10 %, se observó una coloración verde, resultando positivo como se muestra en la figura 39. Cabe destacar que el resultado podría darse a un falso real, o bien a un falso positivo ya que la manera en que se observa, no se ve traslucido y este podría confundirse con el color del extracto en el momento de la prueba realizada.

La reacción de cloruro férrico es una prueba colorimétrica que tiene como objetivo diferenciar la clase de tanino presente, pues los taninos se mezclan con sales de hierro, reaccionando y presentando una coloración característica de cada clase de taninos. Esto se debe al ataque presentado por parte del ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo. (Domínguez, 2011, p.102).

Caracterización Espectroscópica mediante Cromatografía de Gases Acoplado a Masas del Extracto de *Coffea Arábica* Extraído con el Equipo Soxhlet

Para la comprobación de cada uno de los componentes presentes en el extracto de la *Coffea arábica*, se realizó un análisis por cromatografía de gases a través de un detector de masas (GC-MS). Este método de caracterización química es considerada confiable para la identificación y determinación de los componentes importantes de la broza del café.

Figura 45. Caracterización Espectroscópica Mediante Cromatografía de Gases Acoplado a Masas del Extracto de *Coffea arábica* Extraído en Equipo Soxhlet

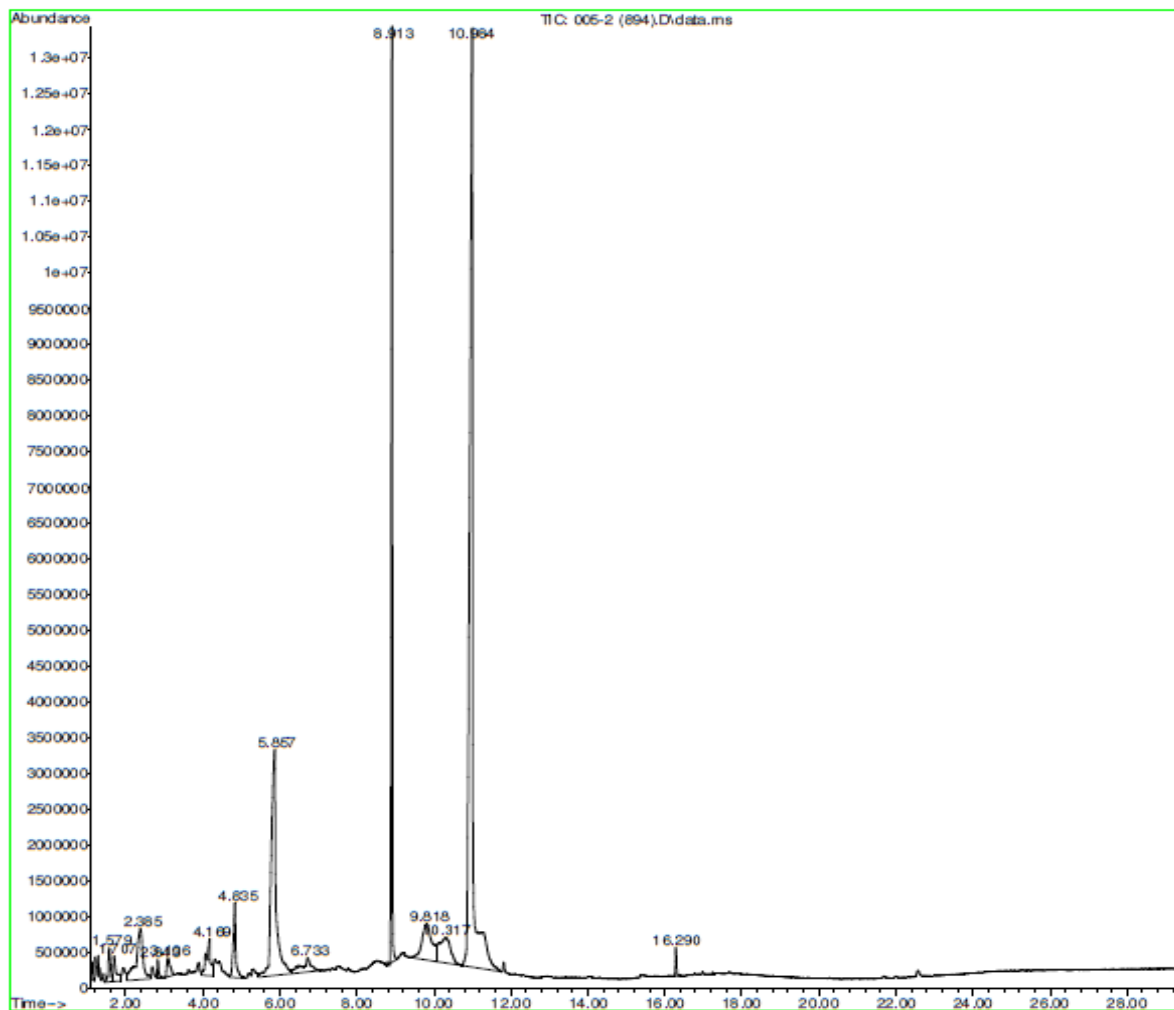
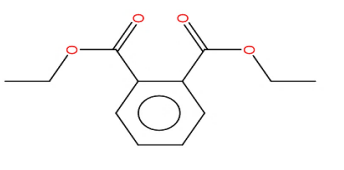
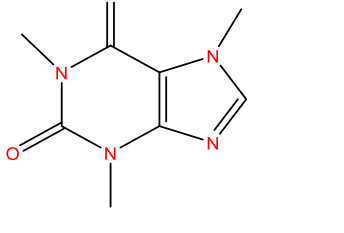
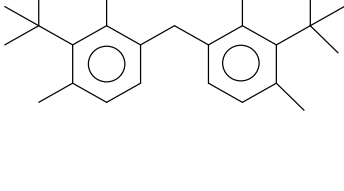


Tabla 17. Resultados Obtenidos mediante el Análisis de CG- MS a través de un Detector de Masas

| Estructura | Componente | Tiempo de retención (min) | Probabilidad de coincidencia (%) | Porcentaje del compuesto en el extracto (%) |
|---|---|---------------------------|----------------------------------|---|
|  | Ftalato de dietilo | 8,910 | 84,5 | 13,96 |
|  | Cafeína | 10,979 | 98,2 | 44,26 |
|  | 2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol] | 16,292 | 89,9 | 0,46 |

La tabla 17, muestra los componentes de mayor proporción en el extracto, que fueron determinados a los 8,910 minutos, los cuales corresponden al ftalato de dietilo, con una probabilidad de un 97 %, luego sigue la cafeína determinada a un tiempo de 10,979 minutos y, por último, siendo el no menos importante, se encontró el 6,6'-metilenbis(2-(*tert*-butil)-3-metilfenol).

El 6,6'-metilenbis(2-(*tert*-butil)-3-metilfenol) podría mostrar actividad antimicrobiana, ya que existen reportes sobre esta propiedad de los compuestos fenólicos, los que actúan

principalmente sobre la membrana de bacterias gram positivas. Esto conduce a la pérdida de la estructura celular induciendo a su muerte programada (Albán, 2017).

Análisis mediante Espectroscopía Infrarroja del Extracto de *Coffea arábica* Obtenido por Método Soxhlet

Una vez determinados los principales componentes del extracto, además de sus porcentajes en la muestra, se complementó el análisis por caracterización de los grupos funcionales mediante espectroscopía infrarroja. Esto se realizó para cada uno de los extractos obtenidos por los distintos procesos, los resultados se muestran en las figuras 42 y 43.

Figura 46. Espectro Infrarrojo del Extracto de *Coffea arábica* Extraído Mediante el Equipo Soxhlet

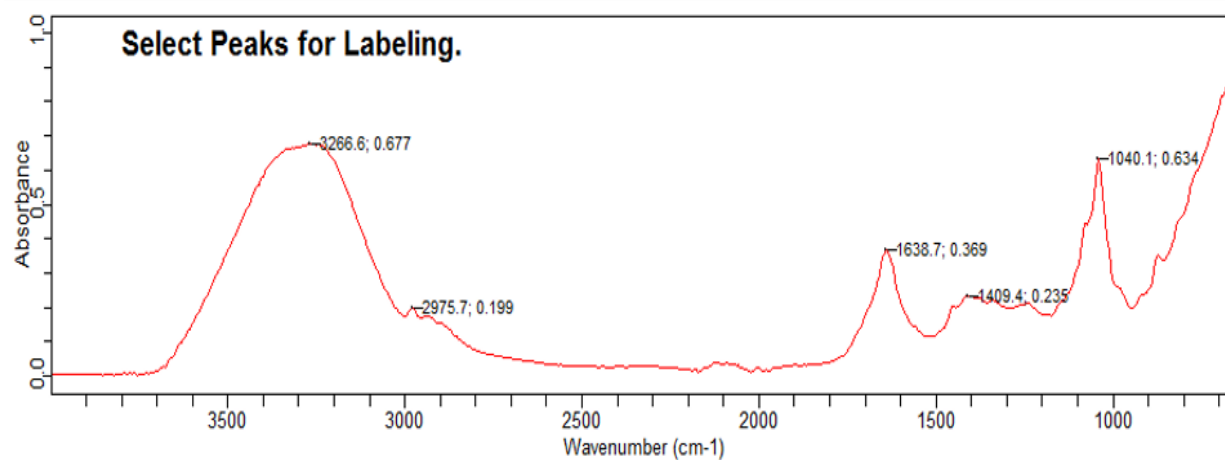


Figura 47. Espectro Infrarrojo del Extracto de Coffe Arábica Extraído Mediante el Equipo Arrastre por Vapor

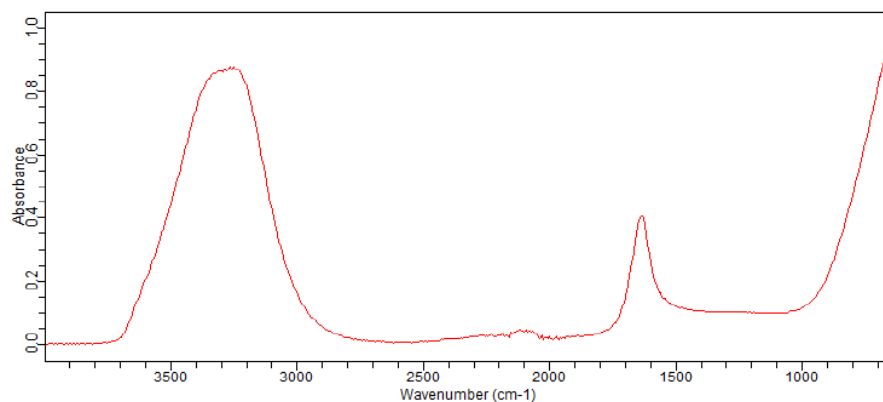


Tabla 18. Asignación de Grupos Funcionales al Espectro Infrarrojo del Extracto de Broza de *Coffea arábica* Obtenido mediante el Equipo Soxhlet

| Señal detectada por el método Soxhlet (cm ⁻¹) | Grupo funcional correspondiente | Rango aproximado de la señal teórica (cm ⁻¹) |
|---|---------------------------------|--|
| 3266 | O-H fenol estiramiento | 3200-3650 |
| 2975 | C-H alcano estiramiento | 3000-2850 |
| 1638 | C=C alquenos | 1680-1610 |
| 1409 | C-H CH ₃ (flexión) | 1470-1340 |
| 1040 | C-O alcohol | 1300-1050 |

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 18, se obtuvieron diferentes señales que coinciden con el espectro IR, debido a que el componente de mayor importancia del extracto de *Coffea arábica* es la señal de fenol. Se analizaron las señales obtenidas en el espectro IR de la muestra del extracto con la tabla de principios de análisis instrumental de Skoog (2015).

Según el espectro IR, las señales que se obtuvieron representan grupos funcionales presentes en el extracto de la broza del café. La primera señal de mayor importancia que se observa en el espectro IR corresponde a la región comprendida entre los 3200 cm^{-1} y los 3650 cm^{-1} . Esta señal pertenece al grupo hidroxilo (OH) característico del grupo fenol (Skoog, 2015).

De acuerdo con la señal reportada respecto al grupo fenol, los compuestos bioactivos como los polifenoles están relacionados con la actividad antimicrobiana debido a la mezcla etanol y agua, que resulta con una mayor extracción del mismo (Albán, 2017).

La señal mostrada en 2975 cm^{-1} , es típica del estiramiento C-H de grupos saturados como los alcanos, que pueden atribuirse a las cadenas laterales del compuesto fenólico identificado por espectroscopia de masas. Otra señal que puede atribuirse al mismo grupo funcional es la que aparece a 1409 cm^{-1} , solo que en este caso es una vibración de flexión C-H. A 1638 cm^{-1} se visualiza una señal atribuible a la tensión C=C de alqueno o aromático, siendo esta última consistente con la estructura del compuesto fenólico. Finalmente, la señal a 1040 cm^{-1} que podría asignarse a la vibración C-O del grupo fenólico presente en el extracto.

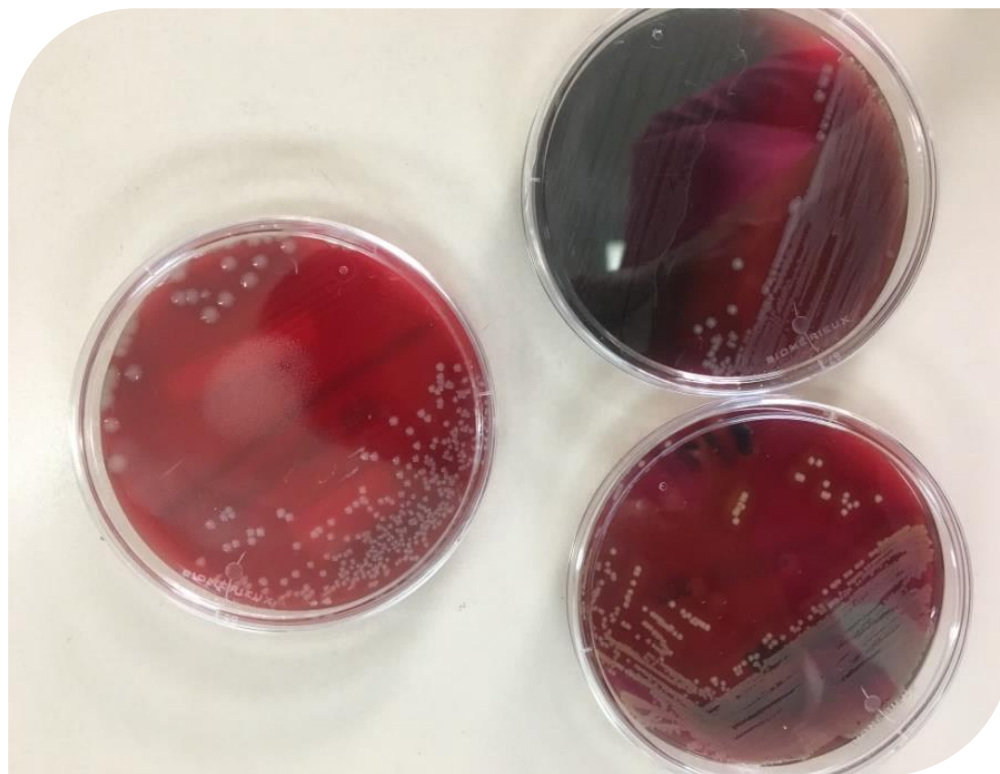
Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana Mediante Microtitulación del extracto de la broza de *Coffea arábica* (café)

Una vez caracterizado el extracto en cuanto a composición, con la determinación de los componentes principales y su contenido porcentual, la siguiente etapa correspondió al análisis de la actividad del extracto. Para esto, primeramente, se evaluó la capacidad antimicrobiana del

extracto de *Coffea arábica* (café) contra las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas en el Hospital Nacional de Niños, Costa Rica, las que fueron cultivadas en agar sangre, medio preparado días antes de las pruebas.

Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico, se diseñó un experimento en el que se determinó la capacidad del extracto de la broza del café para poder inhibir el crecimiento de microorganismos a través de la prueba de sensibilidad antimicrobiana (PSA). La finalidad de una prueba de sensibilidad antimicrobiana es, predecir el comportamiento de una cepa bacteriana en el laboratorio para que esto se pueda extrapolar, es decir, la probabilidad de que la bacteria sea eliminada y que el paciente pueda responder en forma adecuada a la terapia con determinado antibiótico (Herrera, 2004).

Figura 48. Cepas Bacterianas en Agar Sangre Obtenidas en el Hospital Nacional de Niños



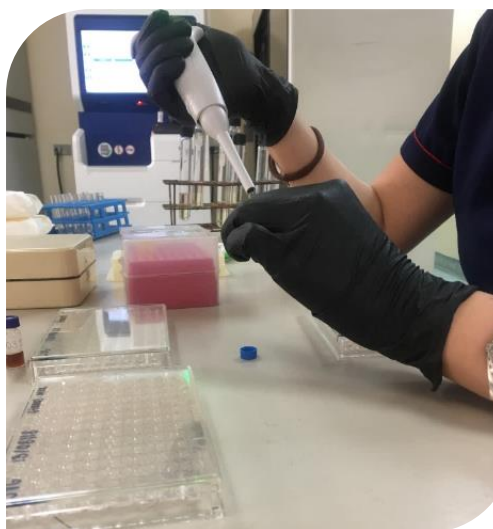
Una vez obtenidas las cepas bacterianas en su respectivo medio, se procedió a realizar un montaje de prueba de sensibilidad antimicrobiana por medio de la técnica de microtitulación. Esta

técnica se por medio de sistemas de inoculación múltiple, donde se han popularizado mediante métodos automatizados de microdiluciones en caldo, estas son fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados (Taroco, Seija y Vignoli, s.f., p.688).

Para llevar a cabo la PSA, utilizando la técnica por microtitulación, se colocó 50 μ L del medio de cultivo tioglicolato en cada uno de los pozos de la placa a emplear. Estudios realizados en el Hospital Nacional de Niños reportan que a través de la técnica por microtitulación, se han podido obtener resultados exitosos para determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), también que el tioglicolato es un caldo enriquecedor para las bacterias que se utilizaron en esta investigación. De acuerdo con la interpretación de resultados analíticos a la hora de utilizar el caldo de tioglicolato, cualquier tipo de crecimiento microbiano en este medio se evidenciará conforme a la turbidez de este (Cedeño, 2015, p.2).

Siguiendo con la técnica de PSA, se colocó 50 μ L del extracto de la broza de *Coffea arábica* por medio de una pipeta electrónica en el primer pozo de cada letra. Una vez colocado el extracto, se procedió a realizar las diluciones dobles del pozo 1 al pozo 10, estas fueron 1:2 hasta llegar a la dilución 1:256 (Tabla 11).

Para la realización de las diluciones fue necesario ir homogenizando cada pozo para asegurar la dilución completa en cada uno de estos. La concentración madre del extracto fue de 301,2 g/mL, para el primer pozo donde fue una dilución seriada 1:2, se obtuvo una concentración real de 150,6 g/mL, luego se realizó la dilución doble hasta el pozo 10, en la que se utilizó una micropipeta múltiple, como se observa en la tabla 11, seguidamente se descartó 50 μ L, con el fin de que se tuviera un volumen de 50 μ L en cada pozo. Cabe destacar que la concentración del extracto fue completamente pura, con el fin de obtener resultados óptimos y exactos del extracto analizado, además de conocer el comportamiento de la actividad antimicrobiana ante cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (figura 44).

Figura 49. Colocación del Extracto Puro a la Placa de Microtitulación**Tabla 19. Diluciones a partir del Extracto de la Broza del Café**

| Concentración del extracto puro de la broza del café: 301,2 g/ml | | |
|--|-----------------|--------------------|
| Número de pozo | Dilución | Concentración g/mL |
| Pozo 1 | Dilución 1:2 | 150,6 |
| Pozo 2 | Dilución 1:4 | 75,3 |
| Pozo 3 | Dilución 1:8 | 37,6 |
| Pozo 4 | Dilución 1:16 | 18,8 |
| Pozo 5 | Dilución 1:32 | 9,4 |
| Pozo 6 | Dilución 1:64 | 4,7 |
| Pozo 7 | Dilución 1:128 | 2,3 |
| Pozo 8 | Dilución 1:256 | 1,2 |
| Pozo 9 | Dilución 1:512 | 0,6 |
| Pozo 10 | Dilución 1:1024 | 0,3 |

El pozo número 11 se desarrolló para el control negativo y el pozo número 12 para el control positivo. El control positivo tuvo medio de cultivo más el inóculo bacteriano y el control negativo tuvo medio de cultivo y extracto puro de broza de café, para un volumen final de 100 μ L en ambos pozos.

Para la preparación del inóculo bacteriano, se tomó con un asa una pequeña cantidad de crecimiento bacteriano en placa de agar sangre de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se colocó 5 mL de solución salina al 0.85 %. Se ajustaron las concentraciones con el patrón McFarland y se agitó vigorosamente para luego medir por medio de un nefelómetro la turbidez hasta llegar a alcanzar un 0.5 % de concentración final, como se observa en la figura 43. El patrón de turbidez McFarland 0.5 % es utilizado para preparación de inóculos en dilución de agar estandarizado, procedimientos de macro y microdilución (Becton Dickinson and Companys, 2005, p.1).

Figura 50. Preparación del Inóculo Bacteriano por el Patrón McFarland



Por último, se colocó 50 µL del inóculo bacteriano estandarizado en cada pozo, se asignó la Fila A-B para la bacteria de *Staphylococcus aureus*, la fila C-D para *Escherichia coli* y la fila E-F para *Pseudomonas aeruginosa*, quedando la F-G libres.

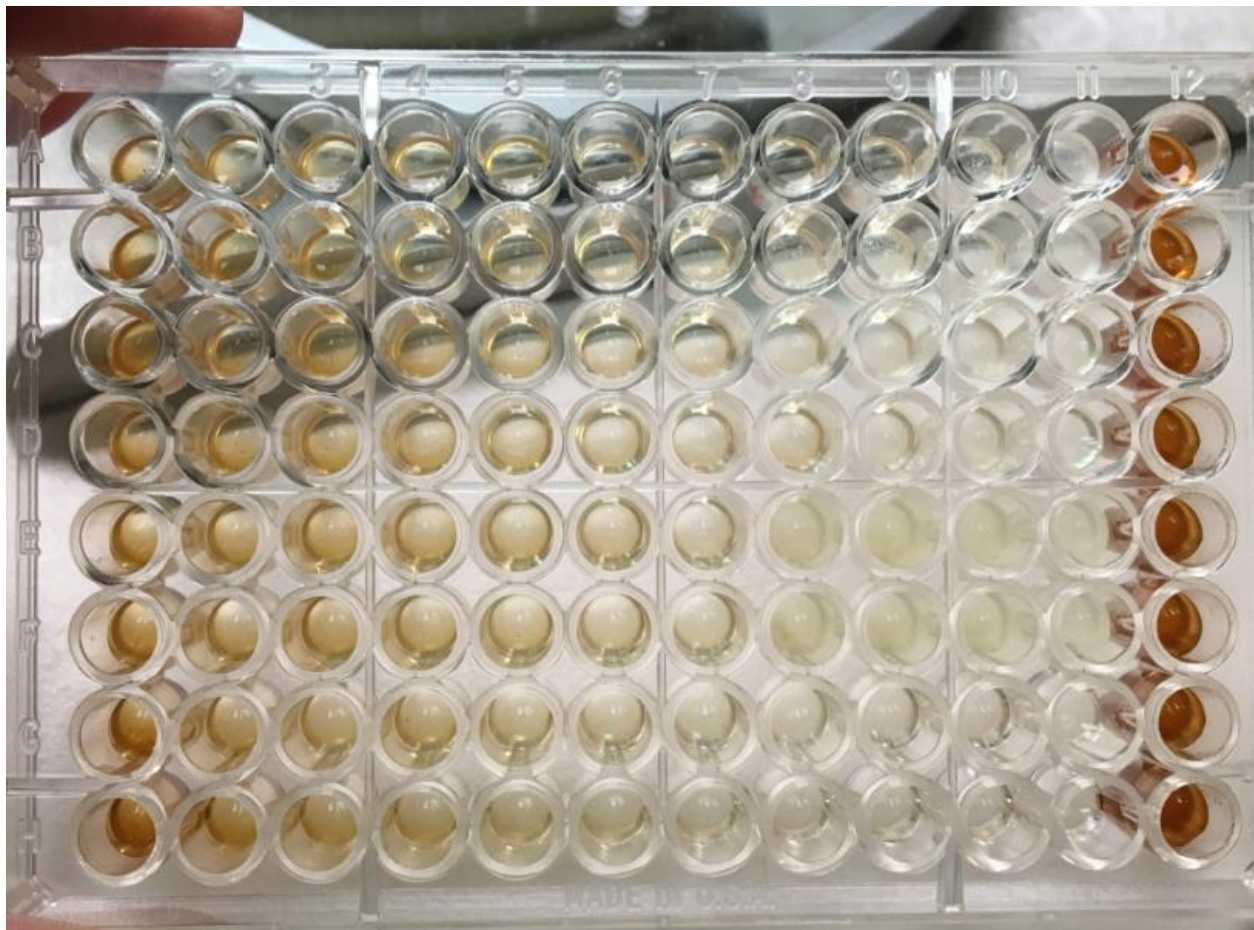
Finalmente, se incubó a 35 °C por 24 horas, cubierta con la tapa de la placa permeable al oxígeno. Las placas de microdilución se deben tapar o sellar con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben (Picazo, 2000, 23).

Interpretación de la prueba de sensibilidad antimicrobiana por microtitulación para el método Soxhlet

Luego del periodo de incubación se realizó la interpretación de los resultados obtenidos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó tomando como referencia el crecimiento observado en el pozo número 11, utilizado como control positivo. En el caso de las placas de microdilución, los controles positivos deben presentar una clara turbidez (Picazo, 2000, 23).

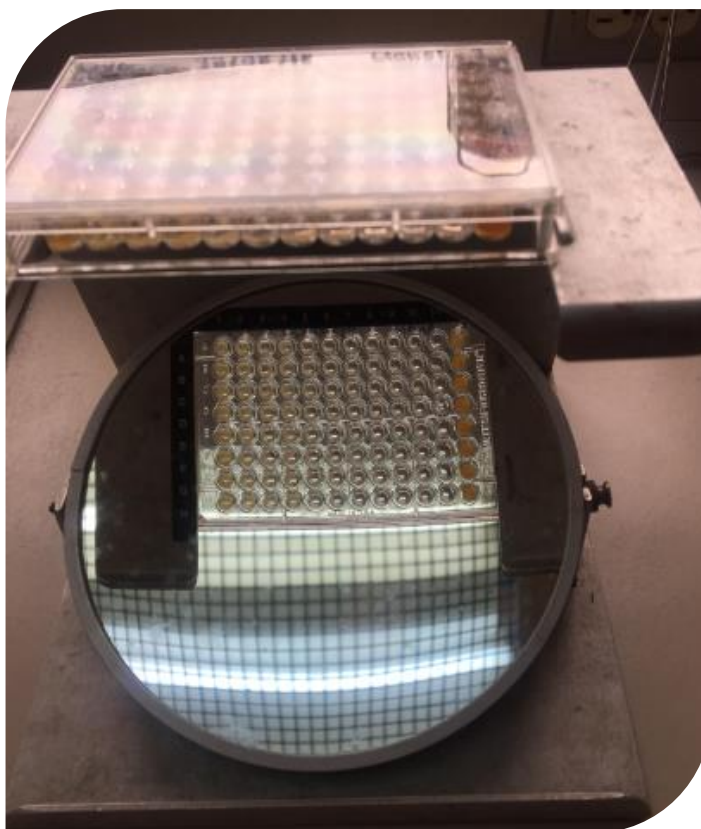
La concentración mínima inhibitoria se determinó (CMI) viendo en cual pozo no hubo crecimiento, usando como referencia el control positivo, en el cual si hubo crecimiento. Basado en este criterio, los resultados obtenidos de turbidez presentados en la placa señalaron una CMI que resultó a partir del pocillo 7 hasta el pocillo 10, y alcanzó una concentración de 2,353 g/mL 1,176 g/ml, 0,588 g/ml, respectivamente (figura 44). Adicionalmente, se debe de tomar en cuenta que los métodos manuales para la CMI son los más fidedignos para predecir el comportamiento de un antibiótico sobre una cepa en el paciente y existen varias formas de realizarlo. El primer método es la dilución en agar, el otro es la microtitulación y el método más reciente es el E-test (Herrera, 2004).

Figura 51. Observación de la Turbidez Tomando como Referencia el Control Positivo (Pozo 11), Extracto Obtenido a través de Método Soxhlet



Para la observación del crecimiento de los pocillos, resultó necesario limpiar la parte inferior de la placa para poder hacer la observación mediante un espejo lector. La lectura es más sencilla utilizando un lector con espejo (también usado en las técnicas de diagnóstico serológico) en el que se refleja la parte inferior de la placa de microtitulación, como se observa en la figura 48 (Picazo, 2000, 23).

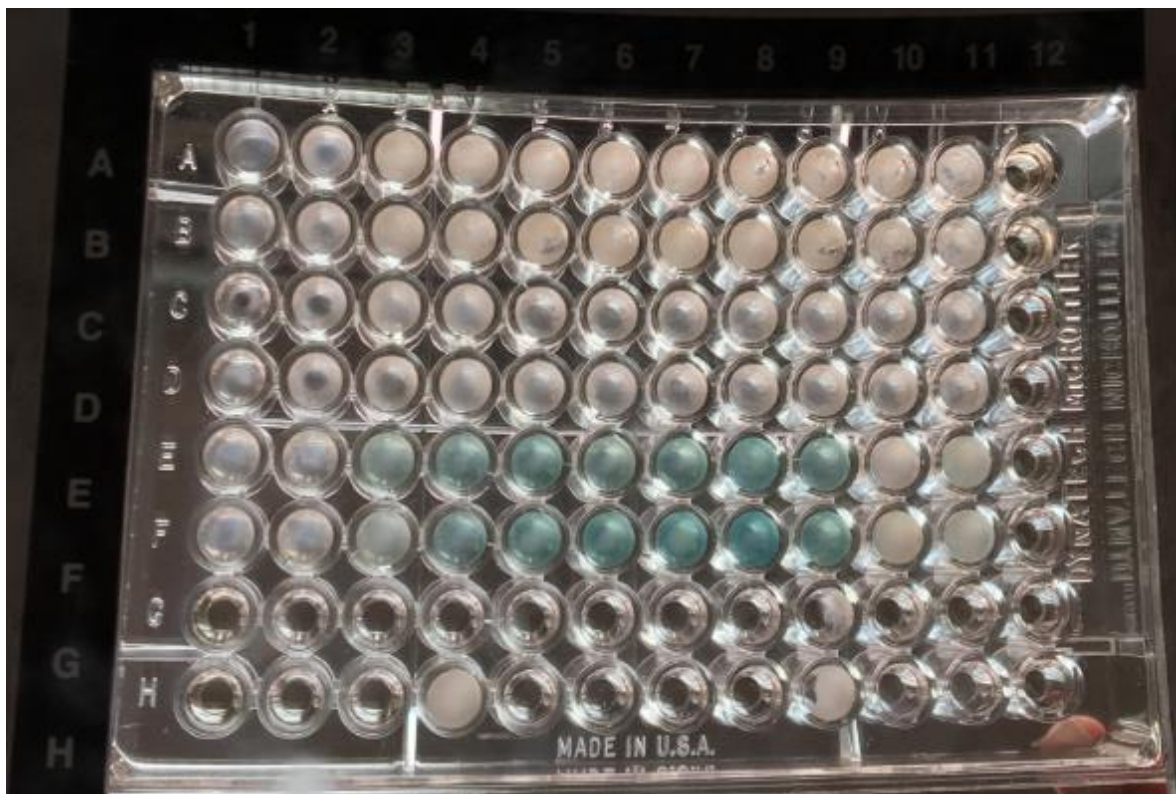
Figura 52. Interpretación de Resultados a través de un Espejo Lector



Esto deja en evidencia que el *Coffea arábica*, es un fitofármaco potencial para ser utilizado como antibiótico, ya que al inhibir ampliamente las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, las hace considerablemente sensibles al extracto vegetal, se debe tomar en consideración que estas bacterias presentan una alta capacidad de resistencia.

Al haber reportado las bacterias como sensibles al extracto de la broza del café y observar que no hay crecimiento bacteriano, es decir, se evidencia una actividad antimicrobiana eficaz y aceptable por parte del extracto de *Coffea arábica*, por lo tanto, se puede destinar este tipo de PSA en relación con las cepas bacterianas estudiadas, una adecuada vía de administración del antibiótico, una biodisponibilidad y el tipo de infección que puede ser hallada en el paciente.

Figura 53. Observación de la Turbidez Tomando como Referencia el Control Positivo (pozo 11), Arrastre por Vapor



En la figura anterior se muestra que, para esta prueba a través del método de extracción por arrastre por vapor, la bacteria de *Pseudomonas aeruginosa* no logró inhibir el crecimiento bacteriano, dado que en el pozo D y en el pozo F se muestra una coloración verde y fluorescente. Cabe destacar que *Pseudomonas aeruginosa* se caracteriza por producir una variedad de pigmentos, como la piocianina, de coloración azul verdosa. La piocianina es un metabolito secundario de coloración azul con la capacidad de oxidar y reducir otras moléculas y, por lo tanto, puede matar a los microbios que compiten contra *Pseudomonas aeruginosa*. (Merino, 2007).

El compuesto fenólico se encontró en el extracto por arrastre por vapor, este fue identificado por medio del infrarrojo, por lo que se debe puntualizar que, la diferencia en esta prueba realizada por arrastre por vapor se dio debido a que el solvente que se utilizó fue el agua, por lo que este pudo haber ocasionado cambios que hagan descartar el método de extracción para la determinación de la actividad antimicrobiana.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en la prueba de Microtitulación

La CMI fue interpretada como la concentración de antimicrobiano, contenida en el pozo de la serie que inhibió el crecimiento visible de la bacteria, para lo cual fue necesario comparar cada uno de los pozos con los controles positivo y negativo.

Los métodos de microtitulación, son una técnica útil para determinar CMI en un gran número de muestras. La ventaja de este método es que, radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, por lo que es importante cuando se trabaja con productos naturales, además que permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Stella, L y Marín, D, 2009, 265).

Figura 54. Turbidez de los Pozos para Hallar la CMI

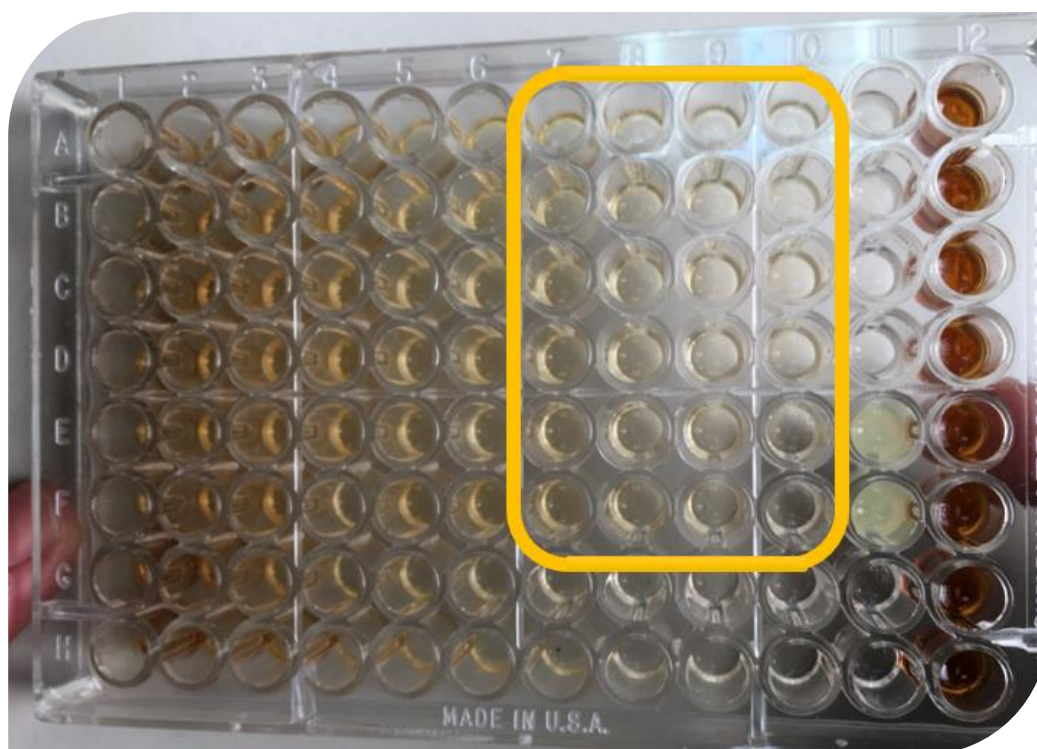


Tabla 20. Resultado Obtenido de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por Microtitulación

| Número de pozo | Dilución | Concentración mínima Inhibitoria (CMI) (g/ml) |
|----------------|---------------|---|
| Pozo 6 | Dilución 1:64 | 4,706 |

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 16, se obtuvo una concentración mínima inhibitoria a partir del sexto pozo. Para llevar a cabo la CMI, esta se determinó con la observación del último pozo, donde no hubo crecimiento, y usando como referencia el control positivo, en el cual si hubo crecimiento. La CMI se define como la mínima concentración de antimicrobiano, ya sea en $\mu\text{g}/\text{mL}$ o g/mL que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Horna, Silva, Vicente y Tamariz, 2005, p. 3)

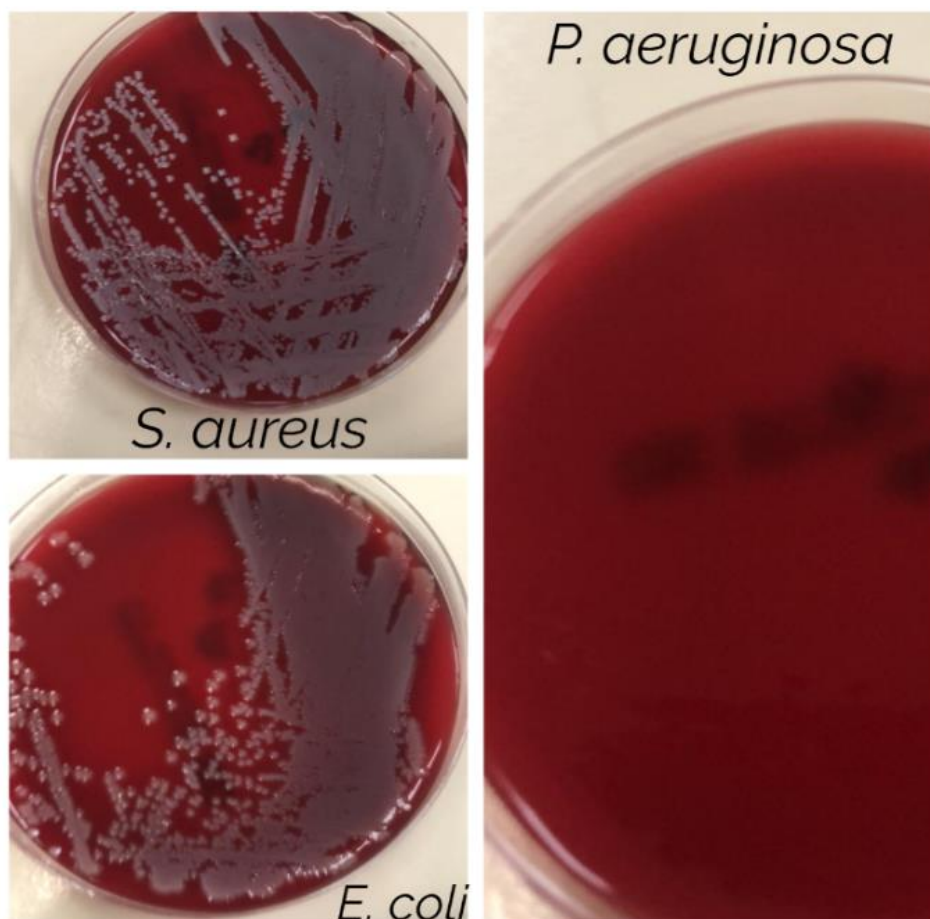
En un estudio realizado por Pruthviraj et al. (2011) se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico del grano de café ante bacterias gram negativos de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, además de bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, en dicho estudio se obtuvieron valores de CMI de 65,5 a 250,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Por otro lado, en estudios realizados en subproductos de bebida de café se obtuvo una CMI de 400 a 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *Escherichia 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 gram negativas y gram positivas, además otro factor que puede afectar, es la variación de las concentraciones de los compuestos fitoquímicos presentes en los extractos de café (Monente, 2005).

Determinación de la propiedad bactericida del extracto de la broza del café

Para la determinación de la concentración mínima bactericida o bacteriostática (CMB), se extrajeron 10 μ L de la placa utilizada PSA, utilizando el pozo 7A-7B, 7C-7D correspondientes a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente. Una vez apartada cada placa para cada bacteria, estas se inocularon en el medio de cultivo agar sangre, donde se incubaron por 24 horas para determinar la cantidad de colonias que crecieron.

Figura 55. Observación de la Propiedad Bactericida del Extracto de la Broza del Café Frente a Cepas Bacterianas



De acuerdo con la figura mostrada anteriormente, se observó inhibición para la *Pseudomonas aeruginosa*, es decir, se inhibió el crecimiento y se murió la bacteria en un 99,9 %. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina más del 99,9 % de los microorganismos viables después 24 horas de incubación (Herrera, 2004).

Por otro lado, se observa que para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se adquiere una propiedad bacteriostática, es decir, que, aunque el efecto del extracto no produce completamente la muerte de este tipo de bacterias, estas impiden la reproducción, por lo que la bacteria envejece y muere sin dejar descendencia alguna.

Tabla 21. Resultado Obtenido de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) por Microtitulación

| Número de pozo | Dilución | Concentración mínima Inhibitoria (CMI) (g/mL) |
|----------------|---------------|---|
| Pozo 6 | Dilución 1:64 | 4,706 |

Elaboración de una crema a base del extracto de la broza de *Coffea arábica*

Para este apartado se procedió a elaborar una crema, según lo indicado en la USP. Para esto se dispensaron los reactivos por separado, se mezclaron y se agitaron conforme al tiempo establecido en el proceso por la farmacopea. Se realizó una crema con el extracto puro de la broza del café con el fin de determinar la inhibición del crecimiento del microorganismo y no del extracto como tal.

Se prepararon 75 gramos de crema con extracto de la broza de café, la crema se realizó con una concentración de extracto de 5 %, ya que esta concentración fue cercana a la CMI. Para ello, primeramente, se fundieron los materiales grasos, de manera que no se descuidara el punto de fusión de cada uno de ellos, una vez fundida, tanto la fase acuosa como la fase oleosa, se agregó la cantidad del extracto determinado y se dejó en agitación por aproximadamente 20 minutos, con el fin de obtener una mezcla completamente homogénea.

Tabla 22. Porcentajes de los Reactivos Utilizados para la Elaboración de la Crema.

| Reactivo | Masa de reactivo basado en 75 g de formulación/ g | Fase a la que pertenece |
|-------------------------------------|--|--------------------------------|
| Alcohol cetílico | 2 | Acuosa |
| Ácido esteárico | 7 | Acuosa |
| <i>Butilhidroxitolueno</i> (BHT) | 0,02 | Acuosa |
| Glicerina | 10 | Oleosa |
| Metilparabenos | 0,15 | Oleosa |
| Propilparabenos | 0,05 | Acuosa |
| Aceite mineral | 20 | Acuosa |
| Trietanolamina | 2 | Oleosa |
| Extracto de <i>Coffea arábica</i> | 5 | |
| Agua destilada c.s.p. | 75 g | |

Tabla 23. Características de la Crema elaborada.

| Características | Resultados obtenidos |
|------------------------|------------------------------------|
| Olor | Característico a la broza del café |
| Color | Café claro |
| Consistencia | Viscosa, consistencia agradable |

Figura 56. Apariencia de la Crema a Base del Extracto de Broza de *Coffea arábica*



Como resultado final, se obtuvo una crema de aspecto brillante, color crema, con un leve aroma característico de la broza del *Coffea arábica*, suave al tacto, cremoso y con facilidad de extender a través de la piel, lo cual ideal para el tratamiento tópico de las afecciones cutáneas ocasionadas por alguna infección por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Como envase primario se eligió un tubo con 75 gramos de crema de manera que sea provechoso para 30 días, dependiendo de la afección cutánea que se pueda presentar, además, este tipo de envase presenta una mayor facilidad y comodidad de aplicación y almacenamiento para el paciente en el momento en que se requiera su aplicación.

Figura 57. Envase Primario de la Crema



Con el fin de brindar una descripción detallada de la crema y sus ingredientes se realizó una etiqueta que indica el nombre de la formulación como “Broza de *Coffea arábica*”; la cual contiene la combinación del nombre científico de la materia prima junto con la parte de la planta utilizada, ya que se pretende visibilizar el hecho de darle una utilidad a un residuo que hoy en día genera un grave impacto ambiental producto del efecto invernadero.

En cuanto a los colores de la etiqueta, esta es de fondo claro, y muestra un logo que representa la broza del *Coffea arábica*, además, contiene toda la información necesaria para su debida aplicación.

extracto, se procedió a realizar las diluciones dobles del pozo 1 al pozo 10, estas fueron 1:2 hasta llegar a la dilución 1:256.

El pozo número 11 se desarrolló para el control negativo y el pozo número 12 para el control positivo. El control positivo tuvo medio de cultivo más el inóculo bacteriano y el control negativo tuvo medio de cultivo y crema en solución salina, para un volumen final de 100 μ L en ambos pozos.

Para la preparación del inóculo bacteriano, se tomó con un asa una pequeña cantidad de crecimiento bacteriano en placa de agar sangre de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, posteriormente se colocó 5mL de solución salina al 0.85 %. Se ajustaron las concentraciones con el patrón McFarland y se agitó vigorosamente para luego medir por medio de un nefelómetro la turbidez hasta llegar a alcanzar un 0.5 % de concentración final.

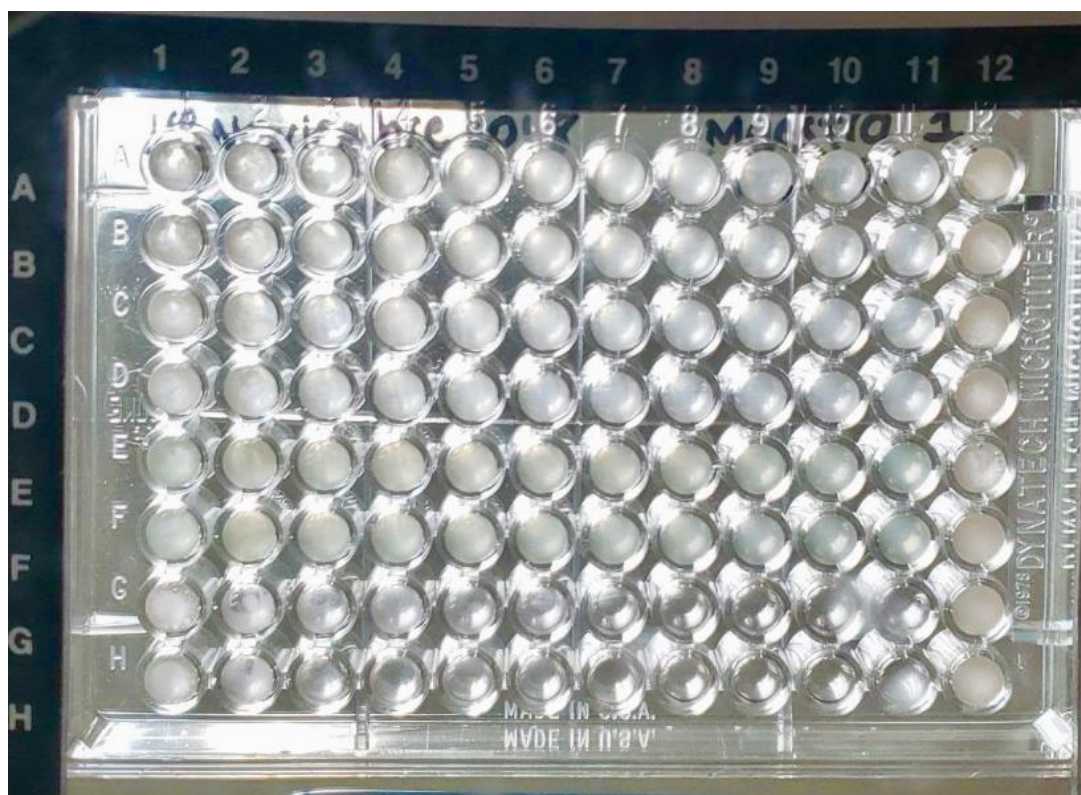
Por último, se colocaron 50 μ L del inóculo bacteriano estandarizado en cada pozo, se asignó la Fila A-B para la bacteria de *Staphylococcus aureus*, la fila C-D para *Escherichia coli* y la fila E-F para *Pseudomonas aeruginosa*, quedando la F-G libre.

Finalmente, todo se incubó a 37 °C por 24 horas, cubierto con la tapa de la placa permeable al oxígeno.

Interpretación de la prueba de sensibilidad antimicrobiana por microtitulación para crema a base de *Coffea arábica* (café)

Para llevar a cabo la determinación de la crema como antibiótico mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana por microtitulación se realizó la lectura a través de un espejo lector como se observa en la figura 59.

Figura 59. Observación de la PSA para la Crema a Base de extracto de *Coffea arábica*(Café)



Después de 24 horas de incubación a una temperatura controlada, se logró visualizar que el tipo de lectura para la determinación de la eficacia de la crema a base de extracto de broza de café no es favorable, dado que la turbidez que se presentó en la mayoría de los pozos de la placa de microtitulación se podría confundir con el crecimiento bacteriano. La turbidez que se presentó en cada uno de los pozos de la placa podría llegar a ser propiamente de la crema, como se observa en la figura 59, pues el control positivo y el control negativo se encontraron turbios a lo largo de toda la interpretación de lectura.

Además de ese problema de turbidez, la crema debería contemplar un blanco solamente con la crema sin extracto, debido a que en la formulación se indicó la adición de parabenos, los cuales tienen la función de evitar el crecimiento bacteriano en la crema, por lo tanto, si la prueba hubiera sido positiva, tenía que haberse descartado que fueran por los parabenos, u otro ingrediente adicional

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Este capítulo recopila las conclusiones alcanzadas luego de la revisión de los datos obtenidos. Por otro lado, formula recomendaciones basadas en las deficiencias percibidas a lo largo de la investigación.

En esta investigación se describió la composición fitoquímica del extracto obtenido de la broza del *Coffea arabica* (café), predominando principalmente los aceites, de un 10 a un 15 %, así como también los taninos de un 0.78 % a un 5,60 %, por lo que se encuentra la pulpa significativa para el potencial antimicrobiano.

Se determinó que el método de extracción con mayor rendimiento fue el equipo Soxhlet con un 47 %, obteniendo 15 mL de extracto puro de broza de café con una masa de 14,05 g.

Las pruebas empleadas para la identificación de metabolitos activos fueron: acetato de plomo al 10 % y cloruro férrico al 10 %. Estas pruebas demuestran la presencia de taninos en el extracto de la broza de café y la identificación de polifenoles.

Con base en los resultados obtenidos por espectroscopia infrarroja se detectó la presencia de los principales grupos funcionales del extracto del café, correspondientes a los compuestos de fenólicos a los que se les atribuye la actividad.

La técnica de prueba de sensibilidad antimicrobiana por medio de la microtitulación resultó ser un método efectivo, pues los resultados fueron rápidos, dando a futuros campos clínicos la posibilidad de un cambio oportuno de terapia antibacteriana, lo que se traduce en una importante reducción de los costos totales en cuanto a días de hospitalización y exámenes de laboratorio, también confiere un control de estandarización y reproducibilidad de los resultados.

La prueba de sensibilidad antimicrobiana (PSA) resultó positiva frente los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, con una actividad antimicrobiana en los pozos del 1 al 6, es decir, con una concentración de 150,6 g/mL, 75 g/mL, 37,6 g/mL, 18,8 g/mL, 9,4 g/mL y 4,7 g/mL. Esto evidenció la capacidad del extracto puro de la broza de *Coffea arábica* para inhibir el crecimiento de las bacterias tomando como referencia el control positivo y negativo de la placa de microtitulación.

Se obtuvo una crema con propiedades organolépticas óptimas para ser utilizada en la piel, de fácil absorción y fácil de remover.

La determinación de la eficacia de la crema a base de extracto de broza de café no fue favorable, dado que la turbidez presentada en cada uno de los pozos de la placa de microtitulación podría llegar a ser propiamente de la crema y podría ser confuso con el crecimiento bacteriano.

Finalmente, se estableció que, el conocimiento de los fitoquímicos, de la estructura bioquímica y propiedades farmacológicas para el aislamiento de metabolitos activos en la especie del *Coffea arábica* de Costa Rica es de suma importancia en la industria farmacéutica especializada en la elaboración de productos en el área de extractos naturales, de manera que el desecho de broza del café pueda ser tratado a una escala mayor y de este modo se puedan desarrollar nuevas formas farmacéuticas a partir de los extractos naturales obtenidos.

Recomendaciones

Se recomienda realizar la extracción utilizando otras técnicas, con el fin de realizar una comparación y obtener cuál técnica adquiere una mejor pureza y mejor rendimiento del extracto.

Para evitar que la muestra pueda sufrir algún cambio después de la extracción, es de suma importancia que el aceite se cubra con papel aluminio, de manera que se le dé protección de la luz y se mantenga en condiciones de temperatura favorables.

Se recomienda tener en consideración, para las pruebas microbiológicas, el tipo de café por separado, ya que, a la hora de realizar la PSA por el método de extracción por el arrastre por vapor, los resultados no fueron positivos lo cual podría ser un indicativo de la variedad del café.

Se invita a los profesionales en farmacia dar a conocer a la población el valor antimicrobiano del *Coffea arábica* a través de extractos de productos naturales, con el objetivo de reducir el impacto negativo en el ambiente de este abundante residuo y a la vez disminuir las emisiones de gases del efecto invernadero que produce el manejo tradicional de la broza.

Se sugiere realizar otros tipos de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, adicionalmente, con un número mayor de especies de bacterias para confirmar una mejor respuesta de la capacidad antimicrobiana de la broza de *Coffea arábica* (café), siendo estas bien realizadas y en un tiempo aceptable. Esto permitiría al médico tomar una serie de decisiones vitales para el buen manejo de la farmacoterapia al paciente y no así a una cepa que el paciente sea resistente al antibiótico escogido por parte del médico.

REFERENCIAS

- Albán, K. (2017). *Actividad antimicrobiana de extractos de subproductos de Coffea arábica y cacao Theobroma cacao L.* Título de Ingeniero en Alimentos. Universidad Católica de Loja. Ecuador.
- Acuña, K., Argüello, J., Espinoza, J., González, M. y Vega, R. (2011). *Una mano amiga del ambiente: COOPEDOTA R.L. y su implementación de carbono neutral.* Universidad de Costa Rica. Recuperado de <http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/11439/Tesina%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Alvarado, M. y Rojas, G. (2007). *Cultivo y Beneficiado del café.* Editorial Universidad Estatal a Distancia. (1ª ed.) Recuperado de https://books.google.co.cr/books?id=15qrSG-5114C&pg=PR16&dq=PRODUCCION+DEL+CAFE+EN+COSTA+RICA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjFo_bi9fbbAhXuqFkKHcizDs0Q6AEIEzAA#v=onepage&q&f=false
- Alvarado, V., Mora, M., Arias, M., Rojas, N. y Chaves, C. (2011). *Resistencia antimicrobiana de cepas de Staphylococcus aureus, Costa Rica.* Costa Rica 20(2). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/260777137_Resistencia_antimicrobiana_de_cepas_de_Staphylococcus_aureus_Costa_Rica
- Ávalos, A. (2015). Bacterias infectan a 5.000 al año en hospitales de CCSS. *La Nación.* Costa Rica. Recuperado de <https://www.nacion.com/el-pais/salud/bacterias-infectan-a-5-000-al-ano-en-hospitales-de-ccss/K7JKHOHI2JD2FMVXJDZ3NKK4EI/story/>
- Acharaporn, D., Nungruthai, S., Jukkrit, W., Atcharaporn O., Nitra, N. y Atchariya, Y. (2016). *Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (Coffea arábica L.) pulp aqueous extracts.* PubMed. Tailandia. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28462135>.
- Arce, N., Morales, J., Yi Li, y Morales, M. (2014). *Interacciones entre fármacos, fitofármacos y plantas medicinales.* Editorial Ocho Libros. Chile. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Miguel_Morales7/publication/281747648_Interaccio

[nes entre farmacos fitofarmacos y plantas medicinales/links/55f889f108aeba1d9f0b21b2.pdf](#)

Arce, R. y Motley, R. (2012). *Dermatología*. Editorial El Manual Moderno. Colombia p. p159-162. (1ª ed.). Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliouiasp/reader.action?docID=3218180&query=enfermedades+de+la+piel+>

BD and BD logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company. (2003). *BD Fluid Thioglycollate Medium (FTM)*. Recuperado de <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/ES-BA-257144.pdf>

Bermúdez, A., Miranda, M. y Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques. *Revista Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 30(8). Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/339/33910703.pdf>

Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S. y Mietzner, T. (2011). *Microbiología Médica*. España: Mc Graw-Hill.

Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. (2ª ed.) Zaragoza: Acribia S. A. Recuperado de <https://www.fitoterapia.net/publicaciones/documentacion/flavonolglycosides-from-ithevetia-peruvianai-284.html>

Bush, L., Schmidt, C. y Pérez, M. (2018). *Manual MSD*. USA. Recuperado de <http://www.msmanuals.com/es-cr/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-estafilococos>.

Caldas, A. (2012). *Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido*. (Tesis Previa A La Obtención del Título de Ingeniera Química. Facultad de Ciencias químicas Escuela de Ingeniería química). Universidad de Cuenca. Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2468/1/tq1111.pdf>

Calle, D. y Mendoza, J. (2017). *Extracción De Taninos De La Borra De Café Mediante Lixiviación Soxhlet*. (Trabajo De Titulación A La Obtención Del Título De Ingeniero Químico.

- Facultad De Ingeniería Química). Universidad De Guayaquil Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18205/1/401-1220%20-%20Extracci%C3%B3n%20de%20Taninos%20de%20la%20borra%20de%20caf%C3%A9%20mediante%20lixiviaci%C3%B3n%20soxhlet.pdf>
- .Cano, T., Godínez, J., Chávez, E y Barrientos, K. (2001). *Obtención y caracterización del aceite esencial de tomillo (thymus vulgaris) cultivado en Guatemala, utilizado en diversidad de productos fitofarmacéuticos*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación Facultad de Ingeniería Centro de Investigaciones de Ingeniería. Recuperado de <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puidi/INF-2001-075.pdf>
- Carrasco, M., Guzmán, M., Rojas, S. y de la Torre, J. (falta el año) Celulitis por cuerpo extraño. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 41(2),2. Recuperado de [file:///C:/Users/jvalverde/AppData/Local/Packages/Microsoft.MicrosoftEdge_8wekyb3d8bbwe/TempState/Downloads/449-1381-2-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/jvalverde/AppData/Local/Packages/Microsoft.MicrosoftEdge_8wekyb3d8bbwe/TempState/Downloads/449-1381-2-PB%20(1).pdf)
- Carrión, A. y García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica*. (Tesis previa a la obtención del título de Bioquímica y Farmacéutica), Universidad de Cuenca. Facultad De Ciencias Químicas. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Cuenca. Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
- Castillo, K. (2013). *Manual electrónico de control de calidad en medios de cultivo y cepas de referencia*. (Tesis para para la titulación Químico farmacéutico biólogo). Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de estudios superiores Zaragoza. México. Recuperado de https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_castillo_carranza.pdf
- Cedeño, J. (2015). *MEDIO DE TIOGLICOLATO USP Medio de cultivo Caldo Tioglicolato USP*. MedicaBac Laboratorio. Recuperado de <http://www.labmedibac.com/wp-content/uploads/2015/04/MEDIO-DE-TIOGLICOLATO-USP-MEDIBAC-LAB.pdf>

- CENICAFÉ. (2015). *Caracterización microbiológica y fisicoquímica de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje*. Recuperado de: [//www.cenicafe.org/es/publications/arc050%2801%29005-023.pdf](http://www.cenicafe.org/es/publications/arc050%2801%29005-023.pdf)
- Cervantes, E., García, R. y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus* *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 28-30. Recuperado de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/38917016/Caracteristicas-generales-del-Staphylococcus_1.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1519856363&Signature=JG%2BDR8cYzsmf5nHaK2FG3oF%2Bk3o%3D&responsecontent-disposition=inline%3B%20filename%3DCaracteristicas_generales_del_Staphyloco.pdf
- Contreras, E. y Ruiz, J. (2012). *Estudio comparativo de dos métodos de extracción para el aceite esencial en la cascara de pomelo (Citrus máxima)*. (Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Químico). Universidad de Cartagena. Facultad de ingeniería. Colombia. Recuperado de http://190.242.62.234:8080/jspui/bitstream/11227/108/1/Proyecto%20final%20de%20grado%20_14-11-2012_.pdf
- Daljit, A., Gurinder, K. y Hardeep, K. (2009). *Antibacterial activity of tea and coffea: their extracts and preparations*. India. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7868837>
- Días, T. (2010). *Pulpa de café: Coffea arábica L: como fuente alternativa de antioxidantes*. (Tesis de grado previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico). Universidad Católica de Loja.. Recuperado de http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/707/3/UTPL_Días_Curay_Alejandra_Tatiana_1064344.pdf
- Díaz, L. (2003). Resistencia Bacteriana. *Revista Cubana* 3 2(1),44-8. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v32n1/mil07103.pdf>
- Dickinson and Company. BD. (2005). *Patrón de turbidez BBL preparado*. Recuperado de http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421%280205%29_es.pdf

- Domínguez X. A. (1980) *Método de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa.
- Echeverri, D., Buitrago, L., Montes, F., Mejía, I. y González, M. (Marzo/Abril, 2005). Café para cardiólogos *Revista colombiana de cardiología (RCC)*, 11(8). Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcca/v11n8/v11n8a1.pdf>
- Estrada, T., López, C, Saucedo. (falta inicial de nombre), Thompson, M. López, D., J y Rosado, J. (2009). Association of Diarrheagenic Escherichia coli Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic E. coli with Acute Diarrhea. *American Society for Microbiology*. 47(1), 93–98. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620860/>
- Esquivel, P. & Jiménez, V. 2012. Functional properties of coffee and coffee byproducts. *Food Research International*. 46(2), 488-495
- Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (2010). *La variedad colombiana: Veinte años de adopción*. Recuperado de <https://www.cenicafe.org/es/publications/bot022.pdf>
- Ferrandis, V. (2013). *Formas Farmacéuticas y Vías de Administración* Colegio profesional de fisioterapeutas de Castilla y León. Recuperado de <http://cofsegovia.portalfarma.com/Documentos/Curso%20Fisioterap%C3%A9utas/3.-%20FORMAS%20FARMAC%C3%89UTICAS%20Y%20V%C3%8DAS%20DE%20ADMINISTRACI%C3%93N.pdf>
- Fox, S. (2011). *Fisiología humana* (12ª ed.). México: McGraw-Hill Interamericana S.A.
- García, J. y Hurlé, J. (2013). *Anatomía Humana* Mc Graw-Hill. España. p.14-16. Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliouiasp/reader.action?docID=3228954&query=>
- García, F., Calderón, J. y Rivera, M. (2014). Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de Stander (Colombia). *Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 21(3). Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169833713008.pdf>
- Giraldo, E., Bernal, M., Morales, M y Pardo, A. (2015). Descripción del uso tradicional de plantas medicinales en mercados populares de Bogotá, D.C. Artículo original producto de la

investigación. Colombia, NOVA. 13 (23), 73-80. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n23/v13n23a07.pdf>

Gómez, G. (2010). Cultivo y beneficio del café. *Revista de Geografía Agrícola. México*, 45(2). Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/757/75726134008.pdf>

Gómez, O. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógena en Colombia. *Revista Médica Revista chilena Infectología*. 31 (5), 577-586. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4469391/>

Herrera, M. (2004). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de laboratorio. *Revista médica, Hospital Nacional de Niños, Costa Rica*. 34 (0): 1-10. Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010

Horna, G., Silva, M., Vicente, W. y Tamariz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Heredia. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú*. 16 (1),3. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v16n1/v16n1ao6.pdf>

Infante, K. (2016). *Determinación del contenido de esteviósidos y rebaudiósidos de la planta Stevia Rebaudiana desarrollada in vitro, así como su análisis comparativo en ejemplares cultivados en campo.* (Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias en el área de biotecnología vegetal). Universidad Autónoma de Aguascalientes. Facultad de Química. México. Recuperado de http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/707/3/UTPL_Días_Curay_Alejandra_Tatiana_1064344.pdf

Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE). (2018). Ing. Rolando Chacón Araya M.Sc. Jefe Unidad de Industrialización y Control de Calidad ICAFFE

Inserto Patrón McFarland. Medellín. España. O-P. PD-311. Pag 1. Recuperado de <http://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2017/07/Patr%C3%B3n-McFarland-05072017-O-P.PD-311-INSERTO-05072017-MDM-cient%C3%ADfica.pdf>

- Janilas, J. (2016). *Resistencia bacteriana en cultivos de pacientes ingresados en el Hospital Humberto Alvarado de Masaya en el periodo de enero de 2014 a enero de 2015*. Universidad Autónoma de Nicaragua. file:///C:/Users/1305-15/Downloads/RESISTENCIA%20MICROBIANA%20EN%20CULTIVOS%20S%20AERUS.pdf
- Lansing M., Prescott, J., y Klein, A. (2004). *Microbiología* Editorial McGraw-Hill Interamericana. España. Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliouiasp/reader.action?docID=3196033&query=microbiologia>
- López, L. (2012). *Producción de Raíces finas y micorrización en café (Coffea arábica L) Cultivado bajo sistema convencional y orgánico en Turrialba Costa Rica*. Universidad Nacional de Agricultura. Turrialba. Costa Rica. Recuperado de <https://www.catie.ac.cr/attachments/article/551/Tesis-Grado-LTLopez-2012.pdf>
- López, G. (2013). *Frecuencia de bacterias patógenas su Patrón de sensibilidad antibiótica en el HGR no25 en relación con el cuadro básico de medicamentos*. (Tesis de grado). Universidad nacional autónoma de México. Facultad de estudios superiores Zaragoza, Distrito Federal. 2013. Recuperado de https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_lopez_galvan.pdf
- Lujan, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica. Incorporado al In Chemical Abstracts Service. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v48n4/v48n4a09.pdf>
- Martínez, L. (2016). Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Revista Médica Valdecilla*, 1(1). Recuperado de http://www.humv.es/revista-valdecilla/1_1/rev_med_valdecilla_1_1_completa.pdf
- Martínez, D.M. (2016). *Laboratorio de Farmacognosia, Libreta de Laboratorio*. Universidad Internacional de las Américas UIA, San José Costa Rica.

- Mahmood, Z. y Zafar S. (2013). Antibiotic natural products: Opportunities and challenges. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*,. 1,826.
- Medicina y laboratorio. (2009). Centro para el control y la prevención de enfermedades- CDC, Organización Mundial de la Salud. *EDIMECO*, 15 (12-13),9. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl0911-12d.pdf>
- Medina, M., Casado, M. C., & Torrico, G. (2012). Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología. *Revista de Investigación*. 2(4), 1–42. Recuperado de <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia Recuperado de <https://books.google.co.cr/books?id=5RjS6B0X5RgC&pg=PA203&dq=definici%C3%B3n+de+un+medio+de+cultivo+microbiologico&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiUzbuW9NjbAhWGjVkJHV0VApUQ6AEIQTAF#v=onepage&q=definici%C3%B3n%20de%20un%20medio%20de%20cultivo%20microbiologico&f=false>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, L. y Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Perú Medica*. Perú.28 (4), 648-56. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a13v28n4.pdf>
- Moore, K., Dalley, A y Agur, A. (2010). *Anatomía con orientación clínica*. Editorial Wolters Kluwer Heatl España: Lippincott Willians & Wilkins
- Negróni, M. (2009). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. (2da ed.) Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina. Recuperado de <https://books.google.co.cr/books?id=Gxmui-vjZBgC&pg=PA129&dq=resistencia+bacteriana+Natural&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjHwc3e3rrdAhUQuVkJHWXtBhEQ6wEIJjAA#v=onepage&q=resistencia%20bacteriana%20Natural&f=false>

- Oderiz, S., Leotta, G. y Galli, L. (2007). Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un hospital pediátrico Inter zonal de la ciudad de La Plata. *Revista Argentina de Microbiología*. 247(10). Recuperado de https://ac.els-cdn.com/S0325754117301724/1-s2.0-S0325754117301724-main.pdf?tid=f0b426cd-2741-4f67-899f-642abed0fa82&acdnat=1536286689_a16d2a093b68baa2dddc95240df3caaf
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Editorial ICG Marge, SL. España Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliouiasp/reader.action?docID=3226048&query=Staphylococcus+aureus>
- Pelczar, M., Reid, R., y Chan, E. (2011). *Microbiología*. México: McGraw-Hill.
- Peredo, H.A., Palou, E y López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. Universidad de las Américas Puebla. México* 3(1). pp.24-32. Recuperado de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- Pérez, C. (2008). El Uso de las Plantas Medicinales. *Revista Intercultural*. 47-120 https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/8921/tra6_p23-26_2010-0.pdf;jsessionid=9A050E029EE4CF1B40AA7BA30DE75D79?sequence=1
- Pérez, H y Robles, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD. México*. 4 (3), 186-191. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>
- Plasencia, J. E. (2012) *Determinación de las temperaturas de secado para la obtención de un sabor café en polvo*. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana. Facultad de Farmacia y Alimentos, Recuperado de <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/89678.pdf>
- Picazo, J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* Editor (falta el editor) Recuperado de

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

Pozo, G. (2014). *Uso de las plantas medicinales en la comunidad del Cantón Yacuambi durante el periodo Julio- diciembre 2011*. (Tesis para la titulación de médico). La Universidad Católica de Loja. Ecuador. Recuperado de http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/6523/3/Pozo_Esparza_Gladys_Maria.pdf

Puertas, M., Villegas, P. y Rojano, A. (2013). Borra de café colombiano (*Coffea arábica*) como fuente potencial de sustancias con capacidad antirradicales libres in vitro. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 18(3). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962013000300013&script=sci_abstract

Raiza, X. (2011). *Producción e Industrialización de café Soluble caso: Solubles instantáneos realizado en octubre del 2011*. Universidad de Guayaquil. Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1775/1/Galindo%20Veliz%20Xiomara%20Raiza.pdf>

Recinos, G. (2004). *Evaluación del rendimiento de concretos obtenidos en la secuencia extractiva por lixiviación mediante técnica soxhlet con tres solventes (hexano, etanol y agua) a partir de frutos de arrayán (myrica cerifera l.) Recolectados de los bosques naturales del área norcentral de Guatemala*. (Trabajo de graduación para conferirse el título de Ingeniero Químico). Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0926_Q.pdf

Ryan, K. y Ray, J. (2017). *Sherris. Microbiología médica*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. España. Recuperado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169§ionid=162978716>

Rodríguez, C., Medina, G., Cabrera, D., y Diaz, E. (2002). Medicina Natural y Tradicional. Conocimientos y aplicaciones de enfermería en Minas II. *Revista Cubana de Enfermería*. 18(3), 140. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/enf/v18n3/enf02302.pdf>

- Rojas, J. (2015). *Evaluación de la producción de Biogás por medio de la biodigestión anaerobia semicontinua utilizando residuos del beneficiado del café como sustrato*. (Tesis presentada para optar por el grado de Licenciatura de Ingeniería agrícola). Universidad de Costa Rica (UCR). Costa Rica. Recuperado de <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3094/1/39273.pdf>
- Romero, O., Reyes, A., Herrera, A. y Lozoya (falta inicial del autor) (2003). Aceptación de los fitofármacos por médicos y pacientes en clínicas de atención primaria. *Revista Médica del IMSS*. 42(2),126. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2004/im042f.pdf>
- Rosales, R. y Rodríguez, I. (año). *Utilización de pectinas del café (biomasa) para generar geles de usos cosmocéutico*. Universidad Iberoamericana. Costa Rica. Recuperado de <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/187>
- Salas, R. (2014). *Elaboración y evaluación del material didáctico variedades entero-virulentas de Escherichia coli*. (Tesis para la titulación Químico farmacéutico biólogo). Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de estudios superiores Zaragoza. México. Recuperado de https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_salas_vargas.pdf
- Salas, J. (2000). *Obtención de la esencia de café (Coffea arábica) var. típica y su conservación en envases flexibles*. Universidad Nacional Agraria De La Selva. Perú. Recuperado de <https://unibe.ac.cr/revistafarmacia/wp-content/uploads/2018/03/TESIS-1148-RANDY-ROSALES-BONICHE.pdf> p.p
- Sanz, M., Hernández, B. y González, M. (s.f.). *Sección de Microbiología, Servicio de Análisis Clínicos*. Madrid. Recuperado de <http://www.wider.es/casosclnicos/index.php/tag/infeccion-piel-yo-tejidos-blandos/?print=print-search>
- Santamaria, V. y Alvarado, A. (2002). Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. *Revista Central Dermatológica Pascua*. 11(1),19. Recuperado de <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wp-content/uploads/2010/08/flora-cutanea.pdf>

- Shyam, R. y Chandrasekaran, M. (2012). Beverages. En: Chandrasekaran, M. (ed.). *Valorization of food processing by-products*. CRC Press, Boca Ratón.
- Skoog. (2011). Principios de análisis instrumental (9ª ed.). México DF.
- Soria, X. y Carrascosa, J.M. (2007). Flora cutánea normal e infección bacteriana secundaria. *Servicio de Dermatología. Universidad Autónoma de Barcelona. Badalona. España*, 98 (1),1. Recuperado de <http://www.actasdermo.org/es-flora-cutanea-normal-e-infeccion-articulo-resumen-13114206>
- Sotelo, I., Casas, N. y Camelo, G. (agosto, 2010). Borojó (Borojoa pationi): Fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Colombia* 17(3). Recuperado de <http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/7442/6865>
- Stella, L. y Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 42(2), 264-265. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. Recuperado de <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/2687/1409>
- J.C. Tres. (2006). Interacción entre fármacos y plantas medicinales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra. España*. 29 (2), 233-252
- Tenover, F. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. 119 (6), S3-S10. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735149>
- Tortura, G. y Derrick, B. (2011). *Principios de Anatomía y fisiología*. México DF: Editorial médica panamericana.