



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Máster Universitario en Ingeniería Agronómica**

Valorización de residuos de la  
industria cafetalera como fuente  
de productos bioactivos

Jorge Clérigo de Santiago

Directores:

Eva Sánchez Hernández  
Pablo Martín Ramos

Septiembre de 2024



## AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Jesús Martín Gil, referente científico de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia. Me honra haber sido el último de sus alumnos en beneficiarme de sus conocimientos y su experiencia en el trabajo de laboratorio antes de su jubilación. Su legado perdurará en cada uno de los que hemos tenido el privilegio de aprender bajo su tutela.

A mis directores, la Dra. Eva Sánchez Hernández y el Profesor Pablo Martín Ramos, cuya dedicación, guía y apoyo han sido fundamentales para la culminación exitosa de este Trabajo Fin de Máster. Su mentoría ha trascendido la mera supervisión académica: me han iniciado en el apasionante mundo de la investigación, inculcándome el valor del rigor científico y encendiendo en mí la llama de la curiosidad científica.

Al Dr. Vicente González García, investigador del Centro de Investigación y Transferencia Agroalimentaria de Aragón, por su inestimable colaboración al proporcionar los aislados fúngicos esenciales para este estudio.

A mis colegas de Olam Agro Perú S.A.C. y Seda Outspan Iberia S.L., cuya colaboración ha sido clave para la obtención de los materiales necesarios en la realización de los ensayos.

Al equipo de Perk Environmental Ltd., por su perseverancia y profesionalidad ante los desafíos logísticos: su determinación y habilidad para navegar las complejidades aduaneras permitieron que la piel de plata llegara a mis manos pese a los múltiples obstáculos encontrados.

A todos ellos, mi más sincero y profundo agradecimiento. Este trabajo es el fruto de su apoyo, conocimiento y dedicación colectivos.



## Resumen

La industria cafetalera genera una gran cantidad de residuos que usualmente se desechan, generando un problema ambiental y económico. No obstante, estos residuos pueden ser una valiosa fuente de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas. En este contexto, surge la oportunidad de aprovecharlos en protección de cultivos, pre- o post-cosecha. Siguiendo los principios de la economía circular, este Trabajo Fin de Máster propone la extracción y caracterización de productos bioactivos a partir de subproductos del café, así como la evaluación de su actividad antifúngica frente a patógenos que afectan al cafeto y/o a los granos de café almacenados, como *Fusarium xylarioides*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, y *Penicillium verrucosum*. El método propuesto para la recuperación de los residuos de café (como liofilizados tras extracción en medio amoniacal) se ha mostrado rentable para la producción de cafeína, y competitivo frente a los métodos utilizados en la actualidad. Los ensayos de actividad *in vitro* demuestran una alta actividad antimicrobiana de los extractos, con concentraciones mínimas inhibitorias en el rango de 15,6–375, 31,2–1000, 62,5–1000, y 62,5–1500 µg/mL frente a *F. xylarioides*, *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum*, respectivamente, dependiendo del residuo empleado. El extracto con mayor actividad, procedente de la piel de plata, fue ensayado para la protección precosecha de la planta del cafeto, demostrando completa inhibición de la traqueomicosis causada por *F. xylarioides* a una concentración de 62,5 µg/mL. A la misma concentración, el extracto amoniacal de piel de plata también demostró completa protección postcosecha de los granos de café frente a *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum*. Así pues, los extractos amoniacaes de subproductos del café representan una alternativa prometedora a los fitosanitarios de síntesis convencionales, con potencial para mejorar la sostenibilidad de la industria cafetalera.

**Palabras clave:** actividad antifúngica, biorracionales, cromatografía de gases/espectrometría de masas, economía circular, espectroscopía infrarroja, extracto amoniacal, piel de plata, protección postcosecha.



## Abstract

The coffee industry generates a large amount of waste that is usually discarded, creating an environmental and economic problem. However, this waste can be a valuable source of bioactive compounds with antimicrobial properties. In this context, an opportunity arises to use them in crop protection, pre- or post-harvest. Following the principles of circular economy, this Master's Thesis proposes the extraction and characterization of bioactive products from coffee by-products, as well as the evaluation of their antifungal activity against pathogens that affect coffee plants and/or stored coffee beans, such as *Fusarium xylarioides*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, and *Penicillium verrucosum*. The proposed method for recovering coffee residues (as lyophilizates after extraction in an aqueous ammonia medium) has proven to be cost-effective for caffeine production and competitive with currently used methods. *In vitro* activity assays demonstrate high antimicrobial activity of the extracts, with minimum inhibitory concentrations in the range of 15.6–375, 31.2–1000, 62.5–1000, and 62.5–1500 µg/mL against *F. xylarioides*, *A. flavus*, *A. niger*, and *P. verrucosum*, respectively, depending on the residue used. The extract with the highest activity, derived from silver skin, was tested for pre-harvest protection of coffee plants, demonstrating complete inhibition of tracheomycosis caused by *F. xylarioides* at a concentration of 62.5 µg/mL. At the same concentration, the ammoniacal silver skin extract also demonstrated complete post-harvest protection of coffee beans against *A. flavus*, *A. niger*, and *P. verrucosum*. Thus, aqueous ammonia extracts from coffee by-products represent a promising alternative to conventional synthetic pesticides, with the potential to improve the sustainability of the coffee industry.

**Keywords:** antifungal activity, biorationals, gas chromatography/mass spectrometry, circular economy, infrared spectroscopy, aqueous ammonia extract, silver skin, post-harvest protection.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Importancia del cultivo del café .....	1
1.2. El fruto del café .....	1
1.3. Técnicas de procesado del café .....	2
1.4. Descriptiva de los residuos de café .....	4
1.4.1. Cáscara y pulpa de café.....	5
1.4.2. Mucílago .....	5
1.4.3. Pergamino .....	6
1.4.4. Piel de plata.....	6
1.4.5. Posos de café.....	6
1.4.6. Hojas de café.....	7
1.4.7. Flores de café.....	7
1.4.8. Granos con imperfecciones.....	7
1.5. Enfermedades del café.....	8
1.5.1. Enfoques de tratamiento basados en productos naturales .....	9
1.6. Actividad antimicrobiana de los subproductos de café .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1. Subproductos del café .....	18
3.2. Plantas y granos de café .....	18
3.3. Reactivos y aislados fúngicos.....	18
3.4. Proceso de extracción.....	19
3.5. Caracterización de los subproductos .....	19
3.6. Evaluación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> .....	19
3.7. Ensayos <i>in planta</i> .....	20
3.8. Ensayos de protección de granos de café .....	20
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
4.1. Caracterización vibracional de los subproductos del café.....	21
4.2. Caracterización por GC-MS de los extractos de los subproductos del café.....	24
4.3. Actividad antifúngica de los extractos de los subproductos del café.....	31
4.3.1. Actividad <i>in vitro</i> .....	31
4.3.2. Ensayos <i>in planta</i> .....	31
4.3.3. Protección de granos de café.....	32
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
5.1. Composición química de los subproductos del café.....	33
5.2. Actividad antifúngica .....	34
5.2.1. Presencia de constituyentes con actividad antifúngica.....	34
5.2.2. Mecanismo de actuación .....	34
5.2.3. Comparativa con actividades referidas en la bibliografía .....	35
5.3. Limitaciones del estudio y perspectivas futuras .....	35
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>37</b>



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Importancia del cultivo del café

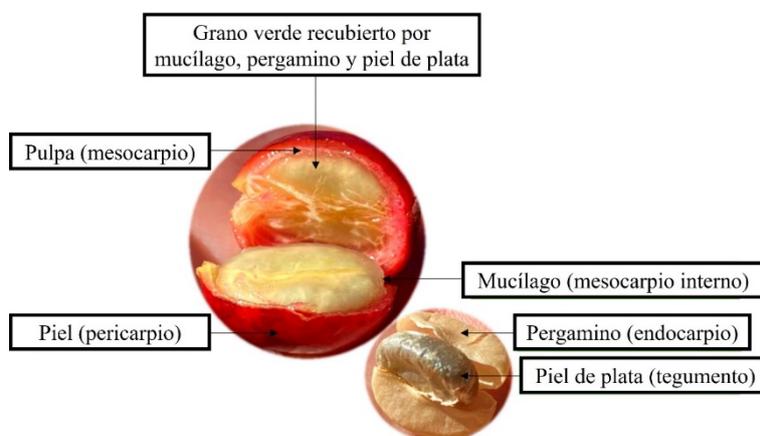
El café es el producto alimentario más importante del mundo y el segundo, después del petróleo, de entre todas las materias primas. Es un cultivo tropical de la familia Rubiaceae, originario de África y Asia, que se obtiene a partir de arbustos o pequeños árboles denominados cafetos del género *Coffea*. El crecimiento de los cafetos requiere regiones tropicales cálidas —entre los trópicos de Cáncer y Capricornio—, precipitaciones abundantes, ausencia de heladas y elevaciones de al menos 2.000 metros sobre el nivel del mar. La primera cosecha significativa puede tardar hasta cinco años, y los árboles pueden seguir produciendo cosechas durante 15 años [1].

Hoy en día, el café se cultiva en más de 70 países de todo el mundo, siendo Brasil, Vietnam, y Colombia los responsables de más del 50 % de la producción mundial [2,3]. El 90% de los países productores son países en vías de desarrollo. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la producción mundial de café es tan importante que se estima una superficie cultivada de unos 10 millones de hectáreas, que sustentan a más de 25 millones de familias. La producción mundial de café verde fue de 10.6 millones de toneladas en 2020 [2].

La importancia económica de este cultivo se debe principalmente a la bebida de café, una infusión preparada a partir de los granos tostados y molidos [3]. Existen más de 124 especies distintas de cafetos. Sin embargo, la mayor parte de la oferta mundial puede atribuirse sólo a dos variedades: arábica (*Coffea arabica* L.) y robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner). Los granos de arábica tienen un sabor más suave y contienen menos cafeína que los de robusta, cuyo aroma es más intenso. La primera se considera superior por sus propiedades sensoriales [4] y, por lo tanto, alcanza precios más altos en el mercado internacional [5], representando así la mayoría de la cuota del mercado mundial del café (75%) [6]. La variedad arábica predomina en Colombia, Kenia, Tanzania, Bolivia, Costa Rica y Zambia; mientras que la variedad robusta es más frecuente en Brasil, Etiopía, Paraguay, Vietnam, Tailandia e Indonesia.

### 1.2. El fruto del café

En cuanto a su anatomía, el fruto del café (Figura 1) es una cereza o baya de 10–15 mm de longitud que contiene dos semillas en su interior, los granos de café. Los granos son semillas elípticas que contienen endospermo y embriones [7]. El fruto del café consta de una piel exterior lisa y dura (pericarpio), normalmente verde en los frutos inmaduros, pero que se vuelve rojo violáceo o rojo intenso cuando está maduro (incluso amarillo o naranja en determinados genotipos). El pericarpio recubre la pulpa blanda, amarillenta, fibrosa y dulce o mesocarpio exterior. Le sigue una capa de mucílago (también llamada capa de pectina) translúcida, incolora, fina, viscosa y muy hidratada. A continuación, hay un endocarpio fino de color amarillento, también llamado pergamino. Por último, la piel de plata recubre cada hemisferio del grano de café (endospermo) [3].



**Figura 1.** Anatomía de la cereza del café. Fuente: Adaptado de Iriundo-DeHond *et al.* [8]

### 1.3. Técnicas de procesado del café

El primer paso para el procesado de la cereza del café es su cosecha, que puede representar hasta el 40% de los costes agrícolas totales. En países cercanos al Ecuador, donde se realizan varias cosechas al año debido a la climatología, la recolección es manual y selectiva, centrándose exclusivamente en la recolección de los frutos maduros, lo que conlleva un aumento en los costes de producción. Por otro lado, en regiones donde la maduración de los frutos es uniforme, como en las zonas cafeteras de Brasil, se emplea la recolección manual en lotes. La cosecha comienza cuando el porcentaje de los frutos inmaduros es inferior al 20%, lo que requiere una posterior separación de los frutos que no están en su punto óptimo de maduración. La recolección mecánica, realizada con cosechadoras, reduce los costos de mano de obra y mejora la competitividad [9].

Posteriormente, la cereza de café pasa por una fase postcosecha, cuya función es separar la semilla de las partes restantes del fruto del café y garantizar una buena conservación del producto final, el grano de café verde. Una vez producido el grano de café verde, se procede a tostarlo y elaborarlo, lo que suele denominarse procesado del grano de café. En el procesado del café se suelen utilizar dos métodos: el procesado en seco y el procesado en húmedo. Estos dos métodos difieren en complejidad y tipo de producto final obtenido. Además, los subproductos generados también dependen del tipo de método de procesado empleado.

En el método seco, las cerezas de café se secan rápidamente para evitar la descomposición de la pulpa, reduciendo su contenido de humedad al 10–11%, y desprendiéndose el pergamino (endocarpio). Después de 3–4 semanas, los frutos se descascarillan mecánicamente para obtener el café sin lavar. Como subproducto principal se genera la cascarilla de café, que incluye la piel exterior, la pulpa, y parte del pergamino. La cascarilla representa el 40–50% del fruto seco, generando una tonelada de cascarilla por tonelada de café producido durante el procesado en seco. Debido a su baja densidad, la eliminación de la cáscara de café constituye un problema, ya que ocupa una gran superficie en los vertederos [7].

En el procesado en húmedo, las bayas se someten primero a una etapa de flotación para separar las maduras de las dañadas o inmaduras, que tienden a flotar [3]. Esta operación requiere que los frutos estén en perfecto estado de madurez y ayuda a reducir la contaminación por la micotoxina ocratoxina A [7]. El siguiente paso es el despulpado, que elimina el exocarpio (piel), y la mayor parte del mesocarpio (pulpa y mucílago) del fruto. Tras el despulpado, la semilla, aún envuelta en el endocarpio (pergamino), debe ser liberada de los restos de pulpa y mucílago mediante fermentación controlada (durante 12–48 h) o mediante un lavado mecánico. Tras la fermentación, se obtiene el café despulpado y dos residuos: uno sólido, denominado pulpa de café, y otro líquido, que corresponde al agua residual con mucílago y azúcares. Aunque el procedimiento en húmedo requiere mucha agua y equipos técnicos específicos, produce cafés de mayor calidad y valor económico. Alternativamente, se puede usar la fricción mecánica para eliminar el mucílago, reduciendo el consumo de agua, y permitiendo la recuperación del mucílago como subproducto. En la Figura 2 se puede apreciar la fracción de pulpa de café separada del grano con mucílago, así como el mucílago cuando es parcialmente eliminado mecánicamente.



**Figura 2.** Cereza de café despulpada mostrando el mucílago que cubre el grano de café, así como el mucílago parcialmente eliminado. Fuente: Adaptado de Rebollo-Hernanz *et al.* [10].

Una vez obtenidos los granos de café lavado o café pergamino, se secan hasta alcanzar una humedad del 12% y se someten a una fricción mecánica para eliminar la cáscara, obteniendo el café verde descascarillado. La cáscara pergamino (Figura 3) que se elimina está compuesta por pergamino y piel de plata. Este residuo supone un 16–18% del grano de café procesado [7].



**Figura 3.** Residuos de pergamino de café obtenidos mediante el método húmedo. Fuente: Adaptado de Rebollo-Hernanz *et al.* [10].

En la Figura 4 se muestra la cáscara de café obtenida siguiendo un procedimiento u otro.



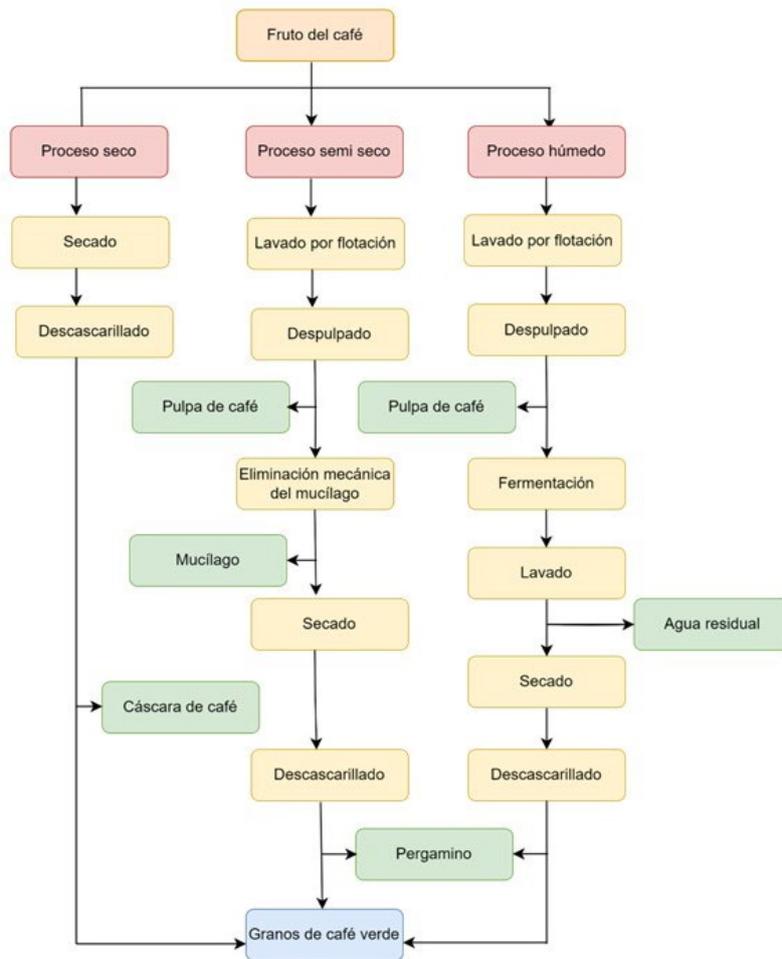
**Figura 4.** Cáscara de café obtenida mediante procesamiento en seco (A) y en húmedo (B). Fuente: Rebollo-Hernanz *et al.* [10]

Aparte del procesamiento de la cereza de café seco o húmedo, existe también el procesamiento semiseco. En este método, a diferencia del húmedo, el despulpado de las cerezas es en ausencia de fermentación, conteniendo el café despulpado restos de mucílago, que pueden secarse directamente.

En la Figura 6 y la Figura 5 quedan resumidos los principales procesos, así como los subproductos generados en cada uno de ellos [7]. El principal subproducto del método seco está compuesto por la piel, la pulpa, el mucílago y el pergamino, todos juntos en una única fracción (cáscara de café). El método húmedo, en cambio, permite potencialmente recuperar la piel y la pulpa en una fracción (43,2% del fruto entero), el mucílago y los azúcares solubles en una segunda fracción cuando no se utiliza la fermentación (11,8%) y, finalmente, el pergamino (6,1%) [3].



**Figura 5.** Procesado en seco (A) y en húmedo (B) para la obtención del café verde. Fuente: Adaptado de Rebollo-Hernanz *et al.* [10].



**Figura 6.** Diagrama de flujo de las técnicas de procesamiento de las cerezas del café (naranja), y de los subproductos que se obtienen (en verde). Fuente: Adaptado de Gemechu [7].

Es importante aclarar que el método de procesamiento para obtener el café verde influye en la composición química de los granos verdes. En general, los granos verdes obtenidos por el procesamiento en húmedo tienen un aroma superior y, por tanto, una mayor aceptación. Además, tienen un mayor contenido de ácidos clorogénicos y trigonelina, y un menor contenido de sacarosa.

#### 1.4. Descriptiva de los residuos de café

En todos los procedimientos el producto final que se obtiene es el grano verde para su comercialización, y en todos se generan varios subproductos o residuos. Por cada tonelada de granos de café producidos, se genera aproximadamente una tonelada de cáscaras durante el procesamiento seco, mientras que, en el procesamiento húmedo y semiseco, los residuos ascienden a más de dos toneladas. Teniendo en cuenta el alto contenido de agua de este último, ambos métodos de procesamiento generan entre el 45 y el 50% de los frutos de café procesados en peso seco.

Se estima que, cada año, la industria del café genera más de 10 millones de toneladas de residuos en todo el mundo. Los residuos principales son la cáscara (pericarpio), pulpa (mesocarpio exterior), mucílago (mesocarpio interior), pergamino (endocarpio) y piel de plata (tegumento). Otros residuos generados son las hojas y las flores del cafeto en el momento de la cosecha, y los posos y los granos de café de baja calidad (que no han alcanzado el grado óptimo de madurez, de diferente color, dañados...) en el momento de elaborar la infusión [11]. Entre estos residuos, los posos de café usados (0,6 toneladas por tonelada de café) representan el residuo más abundante generado durante el procesamiento, mientras que la pulpa de café y las cáscaras representan sólo 0,50 y 0,18 toneladas por tonelada de café, respectivamente [6,12].

Dado que más del 50% del fruto del café no se utiliza para la producción del café verde comercializado y, por lo tanto, se desecha durante el procesado, resulta interesante encontrar aplicaciones para estos subproductos. Entre los fines industriales propuestos se incluyen la producción de energía, la adsorción de compuestos y la fabricación de productos industriales tales como etanol, ácido giberélico,  $\alpha$ -amilasa, ácidos clorogénicos (CGA), proantocianidinas condensadas, ácido quínico y ferúlico. También, dados los altos niveles de antioxidantes fenólicos y fitonutrientes del fruto del café, se está explorando su uso como ingrediente funcional en industria agroalimentaria [3], si bien sus propiedades son dependientes de la especie. Por ejemplo, un estudio en el que se comparó la composición de extractos acuosos de pulpa de café arábica y robusta reveló que la variedad arábica procesa mayores niveles de antioxidantes. Sin embargo, al comparar las actividades antioxidantes de la piel de plata de ambas especies, se observó que la piel de plata de la especie robusta tenía una mayor actividad antioxidante [6].

A continuación, se presenta una descripción más detallada de la composición química de los residuos del café y su diversa gama de aplicaciones en varios sectores [13].

#### 1.4.1. Cáscara y pulpa de café

Una gran parte de la cereza del café corresponde a la pulpa y cáscara, representando alrededor de un 29% de la materia seca. Contiene proteínas (4–12%), lípidos (1–2%), minerales (6–10%), carbohidratos totales (45–89%), así como compuestos fenólicos y cafeína (1,3%) [14]. La pulpa se usa ampliamente en la industria agroalimentaria en mermeladas y zumos, mientras que su harina se emplea en productos de panadería, pastas y salsas [15].

En función del tipo de proceso utilizado para la obtención del café verde, el residuo generado es distinto. Por ejemplo, en el caso del procesado en seco, se obtiene un residuo denominado cáscara de café, compuesto por la piel exterior de la cereza de café, la pulpa y el pergamino. Este residuo es rico en hidratos de carbono (35%), proteínas (5,2%), fibra (30,8%) y minerales (10,7%). El proceso húmedo del café produce un subproducto ligeramente diferente, ya que al prensar el fruto en agua a través de un tamiz queda parte de la pulpa, el mucílago y el pergamino aún adheridos a las semillas. La piel y la pulpa del café tienen una composición similar a la de la cascarilla, es decir, proteínas (7,5–15%), grasas (2–7%) e hidratos de carbono (21–32%) [3].

Además de hidratos de carbono, minerales y proteínas, la pulpa y la cáscara de café contienen altos niveles de cafeína, ácido clorogénico y taninos, lo que limita su uso como pienso o fertilizante (debido a los efectos negativos de estos compuestos sobre la salud animal y la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas). Sin embargo, la biomasa de la pulpa y la cáscara de café se utiliza desde hace tiempo para la producción de biogás. Además, estos subproductos también se utilizan para el cultivo de setas, en el que se aprovecha el 73% del sustrato y la cantidad restante puede utilizarse como fertilizante. Ambos son también útiles para la producción de bioetanol, biocombustibles, enzimas y compuestos bioactivos. Además, la cáscara de café se utiliza en la producción de bioplaguicidas por fermentación con *Bacillus sphaericus* y *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* [6].

Respecto a las posibles aplicaciones en industria agroalimentaria, la fermentación en estado sólido pudiera ser útil en la producción de compuestos con sabor y aroma, enzimas, ácidos orgánicos y antioxidantes. La harina de cáscara y pulpa de café ofrece oportunidades en las industrias de panadería como sustituto de la harina de trigo y como ingrediente mejorado rico en fibra dietética con propiedades funcionales debido a su alto contenido en ácido clorogénico y cafeína [7].

#### 1.4.2. Mucílago

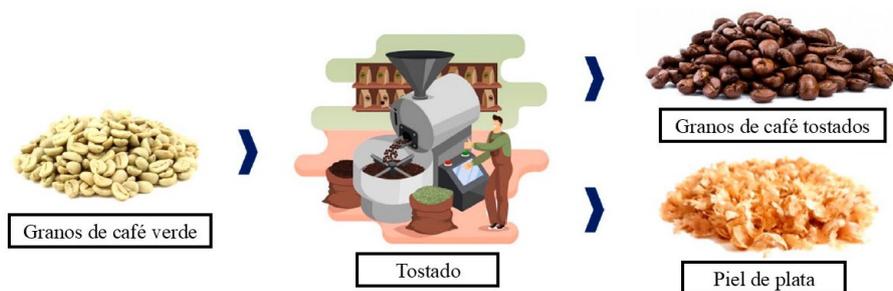
El mucílago está compuesto principalmente por agua (84,2%), proteínas (8,9%), azúcar (4,1%) y sustancias pécticas (0,91%). Los residuos insolubles en alcohol contienen sustancias pécticas (30%), celulosa (8%), y polisacáridos neutros no celulósicos (18%). Las pectinas presentan ácidos urónicos con alta metilesterificación y moderada de acetilación [3].

#### 1.4.3. Pergamino

Este subproducto está constituido principalmente por celulosa (40–49%), hemicelulosa (25–32%) y lignina (33–35%) [3]. El pergamino ha demostrado *in vitro* propiedades hipoglucémicas e hipolipidémicas, incluyendo la capacidad de adsorber glucosa, inhibir la  $\alpha$ -amilasa y la lipasa pancreática, y reducir la digestibilidad del almidón hasta en un 46%. Además, presenta funcionalidades tecnológicas como retención de agua y aceite, absorción, hinchamiento y gelificación, lo que lo convierte en un ingrediente potencialmente valioso en aplicaciones alimentarias. También se han producido xilooligosacáridos con características probióticas, sugiriendo su uso como ingrediente funcional y en envases alimentarios. En este sentido, un estudio realizado por Mirón-Mérida *et al.* [16] empleó un extracto hidroetanólico de pergamino como aditivo antifúngico (frente a *Fusarium sp.* y *Colletotrichum gloeosporioides*) en películas a base de goma gellan para la conservación de alimentos.

#### 1.4.4. Piel de plata

Este residuo se obtiene tras el tostado del grano (Figura 7). Su composición mayoritaria es fibra dietética (60–80%), que incluye celulosa, hemicelulosa y lignina [17]. Su contenido en proteínas es de alrededor del 18% [18]; y en concentraciones más bajas contiene minerales, grasas y carbohidratos reductores [19]. Compuestos fenólicos como el ácido 5-cafeoilquínico y flavonoides como la rutina [20] también están presentes, así como productos de la reacción de Maillard, que se forman durante el proceso de tostado del café [19]. Así pues, la piel de plata de café tiene potencial para utilizarse como ingrediente natural y sostenible en los alimentos [21].



**Figura 7.** Obtención de la piel de plata tras el tostado de los granos de café verde. Fuente: Adaptado de Rebollo-Hernanz *et al.* [10]

El hecho de que el tostado del café añade melanoidinas (hasta un 5%) a los compuestos bioactivos del grano de café, hace que la piel de plata del café se distinga típicamente de la cascarilla, la pulpa y el pergamino del café. Por lo tanto, es evidente la consideración de este material como ingrediente funcional para el desarrollo de alimentos funcionales ricos en fibra. El perfil nutricional y los constituyentes bioactivos funcionales han demostrado su aplicación en diferentes formulaciones alimentarias, como pan y galletas ricos en fibra dietética, bebidas funcionales para la reducción de la grasa corporal y el control del peso, yogur nutracéutico, pastel enriquecido con fibra sustitutiva de la grasa, y pan sin gluten enriquecido con proteínas y fibra dietética [7]. Otra de sus utilidades es como combustible, así como para el compostaje [3].

#### 1.4.5. Posos de café

Los posos de café contienen un alto porcentaje de hemicelulosas (30–40 %), lignina (25–30%) , pequeñas cantidades de celulosa (8,6–13,3%) [6], así como cafeína, trigonelina y ácidos clorogénicos, que muestran una fuerte actividad captadora de radicales, antioxidante y antitumoral, aunque una limitada acción antiinflamatoria y antialérgica [3]. Se han empleado en el desarrollo ciertos alimentos funcionales, como galletas con fibra, bebidas destiladas y magdalenas enriquecidas en fibra y compuestos antioxidantes [7], y como fuente de combustible [6].

#### 1.4.6. Hojas de café

Las hojas de café, tradicionalmente empleadas como bebida en ciertas regiones, contienen abundantes componentes bioactivos. Son ricas en antioxidantes, particularmente en mangiferina y ésteres de ácido hidroxicinámico, con potenciales beneficios para la salud [22]. Sin embargo, su alto contenido en cafeína (24,5 g/kg de hojas secas) puede dañar el suelo y su microbiota. Sus aceites esenciales y compuestos volátiles presentan aplicaciones en etnomedicina, limpiadores faciales, sustitutos del tabaco, piensos, agentes proliferantes, materiales de embalaje absorbentes, y desodorizantes [6].

#### 1.4.7. Flores de café

Las flores del café son una fuente conocida de cafeína y trigonelina. Para la producción de fragancias, el *n*-pentadecano es el compuesto más abundante en las flores de café, seguido del 8-heptadecano y el geraniol. Otros componentes volátiles incluyen epoxigenanoles (2,3-epoxigenaniol y 6,7 epoxigenaniol) y epoxinerol [6].

#### 1.4.8. Granos con imperfecciones

Los granos con imperfecciones (color marrón o negro, dañados por insectos, de frutos inmaduros, etc.) representan el 15–20% de la producción. Desde el punto de vista de la composición química, los principales componentes de los granos de café son los polisacáridos (alrededor del 50%), como la celulosa y las hemicelulosas. Además, contienen una cantidad significativa de carbohidratos solubles (fructosa, glucosa, galactosa y arabinosa, rafinosa y estaquirosa, y sus polímeros), y oligosacáridos como la sacarosa (más del 90%). También contiene aceites y ceras, proteínas, aminoácidos libres, ácidos alifáticos (volátiles y no volátiles), y minerales [7].

En la Tabla 1 se presenta, a modo de resumen, la composición química de los subproductos originados en el proceso de obtención del grano de café verde.

**Tabla 1.** Composición química (en %) de los subproductos de café generados durante el procesado. Fuente: modificado de Lee *et al.* [6].

Componente químico	Café verde	Pulpa	Cáscara	Piel de plata	Café tostado	Posos de café	Flores	Hojas
Carbohidratos	60	44–55	57,8	44	58,5	60,3–82	–	51–63,9
Celulosa	18–65	9,18–63	39–61	16–46	38–41,5	8,6–47,3	3,1–14,6	2,4
Hemicelulosa	3–15	2–66	4–10	4–22	24–39,1	32–43	–	–
Xilosa	–	–	–	4,7–7,6	–	0,3–1,1	2,4	2,7
Arabinosa	20–35	–	–	2–3,5	0,1	1,7–3,6	0,3–3,8	3,5
Manosa	10–20	–	–	1,8–2,6	–	19,1–21,6	0,2–1,3	0,6
Galactosa	55–65	–	–	3,8	–	8,2–16,4	2,7	1–2,3
Ramnosa	–	–	–	–	–	0,1	0,7	–
Lignina	1–5,6	12,2–22	9	1–39	5,8–44,8	23,9–33,6	–	–
Lignina insoluble	–	–	–	21	–	17,6–31,9	–	–
Lignina soluble	–	–	–	7,6	–	1,7–6,3	–	–
Lípidos	8–18	0,3–2,5	0,5–6	0,3–4	11–17	6–38,6	–	–
Proteínas	8,5–13,4	4,4–12	3–13	15–23	3,1–17,4	11,5–18	6,5–9,1	14,4–19
Cenizas	3–5	5,4–15,4	6	4,7–8	1,3–4,3	1,1–2,2	7,5–8,1	8,8–12,4
Cafeína	0,8–4	0,8–5,7	0,5–2	0–1,4	1–2,4	0,02–0,4	0,9–1,1	1,6–2,5
Taninos	–	1,8–8,6	4,5–9,3	0,02	–	0,02	–	–
Ácidos clorogénicos	3,8–10	1–10,7	2–12,6	3–15,8	0,9–8,3	1,8–11,5	1,3	–
Pectinas	2	4,4–12,4	0,5–3	0,02	2	0,01	–	–

Por otra parte, en la Tabla 2 se recogen —de forma condensada— las diversas aplicaciones y propiedades bioactivas de los subproductos del café.

**Tabla 2.** Aplicaciones y propiedades bioactivas de los subproductos del café. Fuente: Adaptado de los artículos de revisión de del Castillo *et al.* [23] y Gemechu [7].

Subproducto de café	Aplicación	Bioactividad
Cáscara	Biocombustibles	
	Tanasa	Antioxidante
	Proteasa	Antimicrobiana
	Endoglucanasa	Antiinflamatoria
	Ácido giberélico	Inhibición de adipogénesis
	Bioabsorbentes	Efecto prebiótico
Pulpa de café	Compost	Fibra alimentaria antioxidante
	Tableros de aglomerado	
	Biocombustible	
	Tanasa	Antioxidante
	$\alpha$ -amilasa	Antifúngica
	Pectinasa	Antibacteriana
Mucílago	Xilasa	Antiinflamatoria
	Cosméticos	Hepatoprotectora
	Bioabsorbentes	Inhibición de lipogénesis
	Compost	
	Alimentación animal	
	Biocombustible	
Pergamino	Cosméticos	
	Alimentación animal	
	Agente espesante	
Piel de plata	Bioenergía	Hipoglucémica
	Bioabsorbentes	Hipolipídica
	Compost	Prebiótica
Posos de café		Antifúngica
		Antioxidante
	Fructooligosacáridos	Antiinflamatoria
	$\beta$ - fructofuranasa	Inhibición de adipogénesis
	Cosméticos	Antimicrobiana
		Antidiabética
Posos de café		Prebiótica
	Biocombustibles	Antioxidante
	Bioabsorbentes	Antimicrobiana
	Alimentación animal	Antiproliferativa
	Fabricación cerámica	Propiedades inmuno-estimulatorias
	Compost	Actividad prebiótica
	Fibra alimentaria antioxidante	

### 1.5. Enfermedades del café

En lo relativo a la planta del cafeto, *Fusarium xylarioides* produce la marchitez o traqueomicosis, una enfermedad vascular que afecta a varias especies de *Coffea*, endémica de los suelos de África. La enfermedad puede atacar en todas las etapas del crecimiento, causando síntomas como marchitamiento, defoliación, necrosis en la madera bajo la corteza y, finalmente, la muerte de las plantas infectadas [24]. La naturaleza de la infección —en el interior de los haces vasculares— hace que la enfermedad sea difícil de controlar y tratar químicamente, con pérdidas de hasta el 80% en la producción de las plantaciones y, en ocasiones, pérdidas totales en pequeñas explotaciones en ausencia de tratamientos [25]. A esto se le suma el escaso desarrollo de programas de gestión de la marchitez del café, que incluyen la falta de variedades resistentes, controles químicos eficientes, escasez de agentes de biocontrol o compuestos bioactivos efectivos [26].

La marchitez del café está restringida actualmente a África central y oriental, pero el hongo patógeno es susceptible de infectar variedades de café cultivadas en América y en el sudeste asiático (si se produjera el transporte) [27]. La prevalencia de la marchitez del cafeto varía en

función del tipo de sistema de producción de café (bosque, semiselva, huerto o plantación), con valores de disminución general del 30–40% del rendimiento en el caso de Etiopía.

En la Tabla 3 se resumen las principales enfermedades sufridas por la planta y el grano de café, así como sus síntomas y tratamientos.

**Tabla 3.** Principales enfermedades sufridas por la planta y el grano del café. Fuente: Elaboración propia a partir del artículo de revisión de Lu *et al.* [28]

Enfermedad	Patógeno	Huésped	Síntomas	Manejo de la enfermedad
Marchitez del cafeto	<i>Fusarium xylarioides</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i> <i>C. excelsa</i>	Amarilleo de hojas, lesiones necróticas marrones.	Sulfato de cobre al 2,5%, siembra de cultivos de cobertura, fungicidas Ridomil Gold y Mancozeb 80%, uso de la cepa <i>Bacillus subtilis</i>
Roya del café	<i>Hemileia vastratrix</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i>	Manchas amarillas en las hojas. Caída de las hojas.	Fungicidas, mezcla de árboles y cultivos, poda, uso de la levadura <i>Pichia membranaefaciens</i> , uso de variedades resistentes
Enfermedad de las cerezas del café	<i>Colletotrichum kahawae</i>	<i>C. arabica</i>	Antracnosis de las bayas más jóvenes. Pudrición.	Inducir floración temprana mediante riego, mezcla de fungicida de cobre y orgánico. uso de variedades resistentes.
Cercosporiosis	<i>Cercospora coffeicola</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i>	Manchas y lesiones marrones en hojas. Caída de hojas. Infecciones en bayas.	Eliminación de malas hierbas, uso de fertilizantes nitrogenados, uso de fungicidas como Clorotalonil
Podredumbre de raíz	<i>Armillaria sp.</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i>	Muerte de los tejidos, marchitamiento y amarilleo de las copas de los cafetos.	Uso de hongos antagonistas, crear barrera en el suelo, uso fungicidas como cloropicrina y bromuro de metilo.

Concerniente a las cerezas y los granos de café, es sabido que están sujetos a la contaminación y colonización por microorganismos durante las diferentes fases de desarrollo, recolección, preparación, transporte y almacenamiento [29]. Además de afectar a las características sensoriales del café, la acción microbiana es perjudicial para la calidad e inocuidad del producto final. Los principales géneros de hongos toxigénicos productores de micotoxinas son *Aspergillus* y *Penicillium* [30], presentes tanto en condiciones de campo como de almacenamiento [31]. La micotoxina más común en el café es la ocratoxina A (OA), con propiedades nefrotóxicas y efectos teratogénicos y mutagénicos [32,33]. Debido al riesgo que supone el OA para la salud humana, la Unión Europea ha elaborado normas sobre los niveles máximos de OA en el café [34]. Los principales productores de OA en el café incluyen *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus carbonarius* [32,35]. Además de la OA, en los granos de café también se encuentran otras micotoxinas como aflatoxinas (AF), patulina y esterigmatocistina [36], principalmente producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* [34]. Los niveles más altos de humedad del café tienden a favorecer el crecimiento de *A. flavus* y la producción de AF [37]. Por su parte, *P. verrucosum*, aparte de ser el principal productor de OA en cereales como el trigo y la cebada en climas templados y fríos [38], también afecta a los alimentos secos almacenados, como el café [30].

#### 1.5.1. Enfoques de tratamiento basados en productos naturales

Los extractos naturales son una alternativa a los tratamientos químicos, pero los estudios sobre su aplicación frente a patógenos asociados al cultivo del café son hasta la fecha limitados, centrados en la roya (*Hemileia vastratrix*). En la Tabla 4 se recoge un listado de los extractos ensayados frente a este patógeno, desglosados por variedad. En la Tabla 5 se muestra la eficacia de la inhibición de la germinación de esporas de la roya del café haciendo uso de diversos compuestos de plantas.

**Tabla 4.** Recopilación de extractos vegetales con actividad contra *Hemileia vastatrix* utilizados en diferentes variedades de *Coffea arabica*. Fuente: Castillo *et al.* [39]

Variedad de café	Extracto
Caturra	Extractos acetónicos y etanólicos de <i>Ricinus communis</i> , <i>Datura ferox</i> , <i>Mansoa alliacea</i> , <i>Tribulus terrestris</i> y <i>Acacia farnesiana</i>
	Extracto alcohólico de raíces de <i>Baccharis glutinosa</i>
Typica and Caturra	Extractos de <i>Cinnamomum verum</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>Larrea tridentata</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Brassica nigra</i> y <i>Piper nigrum</i>
Catucaii 2SL, Catuaii IAC 62, Mundo Novo 379/19	Aceite esencial de canela, citronela, clavo, árbol del té, tomillo, neem y eucalipto
	Extracto supercrítico de <i>Lippia graveolens</i>
	Extractos de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Aloe barbadensis</i> , <i>Moringa oleifera</i> y <i>Nicotiana tabacum</i>
	Extracto etanólico de hojas de <i>Piper aduncum</i>
Otras variedades de <i>Coffea arabica</i>	Extractos acuosos de hojas de <i>Ardisia compressa</i> , <i>Eriobotrya japonica</i> , <i>Ocimum basilicum</i>
	Aceite de hojas de <i>Eremanthus erythropappus</i>
	Extracto de hojas de <i>Allium sativum</i> y <i>Vernonia polysphaera</i>
	Extractos de bulbos de <i>Allium sativum</i> , hojas de <i>Vernonia polysphaera</i> y botones florales de <i>Syzygium aromaticum</i>
	Aceite esencial y extracto de hojas de <i>Cymbopogon nardus</i>

**Tabla 5.** Ensayos experimentales basados en compuestos fitoquímicos de plantas con actividad contra la roya del café. Fuente: Castillo *et al.* [39]

Planta	Clase/compuesto	Eficacia
<i>Baccharis glutinosa</i>	Flavonoides: multijuginol,(Z)-3-hidroxi-1-(2-hidroxifenil)-3-fenil prop-2-en-1-ona, 30-metoxiquercetina y 12a-hidroideguelina	Inhibición del porcentaje de germinación de uredosporas hasta <5%
<i>Camellia sinensis</i>	Monoterpenos: limoneno, linalol, geraniol Sesquiterpenos: $\beta$ -cariofileno.	Reducción significativa de la gravedad de ataque
<i>Bassica nigra</i> <i>Piper nigrum</i>	Alcaloide: piperina Monoterpenos: sabineno, limoneno y $\beta$ -pineno Sesquiterpenos: $\beta$ -cariofileno, $\alpha$ -selineno y germacreno	No se observó una reducción significativa de la gravedad en los tratamientos
<i>Cymbopogon</i> sp. <i>Thymus</i> sp. <i>Cynamomum</i> sp.	Monoterpenos: D-limoneno, cineol, $\beta$ -mirceno, anetol, <i>p</i> -anisaldehído, carvacrol, carvona, limoneno, felandreno, pineno.	Todos los aceites esenciales inhibieron la germinación
<i>Cymbopogon citratus</i> <i>Aloe barbadensis</i> <i>Moringa oleifera</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	Monoterpeno: citral ( <i>C. citratus</i> ) Glucósido antraquinónico: Aloína ( <i>A. barbadensis</i> ) Taninos ( <i>M. oleifera</i> ) Alcaloide: nicotina ( <i>N. tabacum</i> )	Los extractos de <i>M. oleifera</i> y <i>C. citratus</i> resultaron ser los más eficaces
<i>Piper aduncum</i>	Monoterpeno: piperitona	Reducción de la germinación en condiciones de laboratorio
<i>Ardisia compressa</i>	Mezcla de compuestos no caracterizada	Inhibición significativa de la germinación <i>in vitro</i>
<i>Eriobotrya japonica</i> <i>Ardisia compressa</i> <i>Ocimum basilicum</i>	Alcaloides, flavonoides, cumarinas y terpenos.	Inhibición de la germinación a concentraciones de 0,12–0,38%

### 1.6. Actividad antimicrobiana de los subproductos de café

La actividad antimicrobiana de los extractos de subproductos de café está avalada frente a múltiples patógenos fúngicos y bacterianos. En la Tabla 6 se resumen los estudios de actividad antimicrobiana más significativos, especificando el subproducto de café empleado, el/los patógeno(s) frente a los que se ha estudiado su efectividad, y las eficacias referidas (habitualmente en forma de concentraciones mínimas inhibitorias).

**Tabla 6.** Estudio de la actividad microbiana de los subproductos del café frente a diferentes patógenos. Fuente: Elaboración propia a partir de los artículos citados en la misma.

Variedad, procedencia	Subproducto	Medio de extracción	Patógeno	Eficacia	Ref.
Arábica, Guatemala	Posos de café	Agua	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMI = 5000	[40]
			<i>Listeria monocytogenes</i>	CMI = 20000	
			<i>Bacillus subtilis</i>	CMI = 40000	
			<i>Escherichia coli</i>	CMI = 80000	
			<i>Salmonella choleraesuis</i>	CMI = 40000	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMI = 40000	
			<i>Candida albicans</i>	CMI = 40000	
	Infusión de café		<i>S. aureus</i>	CMI = 7500	
			<i>L. monocytogenes</i>	CMI = 30000	
			<i>B. subtilis</i>	CMI = 60000	
			<i>E. coli</i>	CMI = 60000	
			<i>S. choleraesuis</i>	CMI = 30000	
			<i>P. aeruginosa</i>	CMI = 60000	
			<i>C. albicans</i>	CMI = 60000	
Robusta, Vietnam	Posos de café	<i>S. aureus</i>	CMI = 10000		
		<i>L. monocytogenes</i>	CMI = 20000		
		<i>B. subtilis</i>	CMI = 40000		
		<i>E. coli</i>	CMI = 160000		
		<i>S. choleraesuis</i>	CMI = 40000		
		<i>P. aeruginosa</i>	CMI = 80000		
		<i>C. albicans</i>	CMI = 40000		
	Infusión de café	<i>S. aureus</i>	CMI = 81000		
		<i>L. monocytogenes</i>	CMI = 16300		
		<i>B. subtilis</i>	CMI = 32500		
		<i>E. coli</i>	CMI = 325000		
		<i>S. choleraesuis</i>	CMI = 16300		
		<i>P. aeruginosa</i>	CMI = 16300		
		<i>C. albicans</i>	CMI = 32500		

**Tabla 6 (cont).** Estudio de la actividad microbiana de los subproductos del café frente a diferentes patógenos.

Variedad, procedencia	Subproducto	Medio de extracción	Patógeno	Eficacia	Ref.
n.e., Costa Rica	Mucílago	Etanol 95%	<i>Micrococcus luteus</i>	PI = 100, a 50400 µg/mL	[41]
			<i>S. aureus</i>	PI = 35, a 50400 µg/mL	
			<i>Lactobacillus monocytogenes</i>	PI = 50, a 26200 µg/mL	
			<i>Bacillus cereus</i>	PI = 100, a 50400 µg/mL	
			<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	PI = 18, a 50400 µg/mL	
			<i>Lactobacillus plantarum</i>	PI = 18, a 50400 µg/mL	
			<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PI = 18, a 50400 µg/mL	
Muestras comerciales	Granos de café tostado	Agua	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	ZI = 5, concentración n.e.	[42]
	Té negro de hojas de café		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	n.a.	
			<i>P. syringae</i> pv. <i>lisi</i>	ZI = 2, concentración n.e.	
			<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	n.a.	
Arábica, México	Granos verdes	Agua	<i>E. coli</i>	CMI > 8000	[43]
			<i>Enterobacter cloacae</i>	CMI > 8000	
			<i>Salmonella dublin</i>	CMI > 8000	
			<i>S. aureus</i>	CMI > 8000	
			<i>Enterococcus faecalis</i>	CMI > 8000	
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMI > 8000	
			<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CMI > 8000	
		<i>Staphylococcus hominis</i>	CMI > 8000		
		Etanol 60%	<i>E. coli</i>	CMI = 8000	
			<i>E. cloacae</i>	CMI > 8000	
			<i>S. dublin</i>	CMI > 8000	
			<i>S. aureus</i>	CMI ≥ 8000	
			<i>E. faecalis</i>	CMI > 8000	
			<i>K. pneumoniae</i>	CMI > 8000	
<i>S. haemolyticus</i>	CMI > 8000				
<i>S. hominis</i>	CMI > 8000				

**Tabla 6 (cont).** Estudio de la actividad microbiana de los subproductos del café frente a diferentes patógenos.

Variedad, procedencia	Subproducto	Medio de extracción	Patógeno	Eficacia	Ref.
Arábica, México	Café tostado	Agua	<i>E. coli</i>	CMI = 4000 – >8000	[43]
			<i>E. cloacae</i>	CMI >8000	
			<i>S. dublin</i>	CMI >8000	
			<i>S. aureus</i>	CMI = 4000 – >8000	
			<i>E. faecalis</i>	CMI >8000	
			<i>K. pneumoniae</i>	CMI = 4000	
	Etanol 60%	<i>S. haemolyticus</i>	CMI = 4000		
		<i>S. hominis</i>	CMI = 4000		
		<i>E. coli</i>	CMI = 4000 – >8000		
		<i>E. cloacae</i>	CMI > 8000		
		<i>S. dublin</i>	CMI = 8000		
		<i>S. aureus</i>	CMI = 2000–4000		
	Posos de café	Agua	<i>E. faecalis</i>	CMI = 8000	
			<i>K. pneumoniae</i>	CMI = 4000	
			<i>S. haemolyticus</i>	CMI = 4000	
			<i>S. hominis</i>	CMI = 2000	
			<i>E. coli</i>	CMI = 4000 – >8000	
			<i>E. cloacae</i>	CMI = 8000	
Etanol 60%	<i>S. dublin</i>	CMI = 8000			
	<i>S. aureus</i>	CMI = 4000			
	<i>E. faecalis</i>	CMI = 8000			
	<i>K. pneumoniae</i>	CMI = 2000			
	<i>S. haemolyticus</i>	CMI = 2000			
	<i>S. hominis</i>	CMI = 2000			

**Tabla 6 (cont).** Estudio de la actividad microbiana de los subproductos del café frente a diferentes patógenos.

Variedad, procedencia	Subproducto	Medio de extracción	Patógeno	Eficacia	Ref.
Muestras comerciales	Posos de café	Metanol:agua (40:60 v/v)	<i>Aspergillus flavus</i>	CMF = 460	[44]
			<i>Aspergillus parasiticus</i>	CMF = 420	
			<i>Aspergillus nidulans</i>	CMF = 380	
			<i>Aspergillus terreus</i>	CMF = 390	
			<i>Aspergillus fumigatus</i>	CMF = 380	
Muestras (cápsulas) comerciales	Posos de café	Etanol:agua (3:1, v/v)	<i>Alternaria alternata</i>	CMI > 1100	[45]
			<i>A. fumigatus</i>	CMI > 1100	
			<i>Alternaria infectoria</i>	CMI > 1100	
			<i>A. niger</i>	CMI > 1100	
			<i>C. albicans</i>	CMI > 1100	
			<i>Candida glabrata</i>	CMI > 1100	
			<i>Candida krusei</i>	CMI = 137,5	
			<i>Candida parapsilosis</i>	CMI = 275	
			<i>Fusarium oxysporum</i>	CMI > 1100	
			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CMI = 137,5	
			<i>Trichophyton rubrum</i>	CMI = 137,5	
			<i>A. alternata</i>	CMI > 1770	
			<i>A. fumigatus</i>	CMI > 1770	
			<i>A. infectoria</i>	CMI > 1770	
			<i>A. niger</i>	CMI > 1770	
<i>C. albicans</i>	CMI > 1770				
<i>C. glabrata</i>	CMI > 1770				
<i>C. krusei</i>	CMI = 55,31				
<i>C. parapsilosis</i>	CMI = 110,63				
<i>F. oxysporum</i>	CMI > 1770				
<i>T. mentagrophytes</i>	CMI = 27,66				
<i>T. rubrum</i>	CMI = 27,66				
	Café molido				

**Tabla 6 (cont).** Estudio de la actividad microbiana de los subproductos del café frente a diferentes patógenos.

Variedad, procedencia	Subproducto	Medio de extracción	Patógeno	Eficacia	Ref.	
Muestras (cápsulas) comerciales	Posos de café descafeinado		<i>A. alternata</i>	CMI > 2400	[45]	
			<i>A. fumigatus</i>	CMI > 2400		
			<i>A. infectoria</i>	CMI > 2400		
			<i>A. niger</i>	CMI > 2400		
			<i>C. albicans</i>	CMI > 2400		
			<i>C. glabrata</i>	CMI > 2400		
			<i>C. krusei</i>	CMI = 150		
			<i>C. parapsilosis</i>	CMI = 150		
			<i>F. oxysporum</i>	CMI > 2400		
			<i>T. mentagrophytes</i>	CMI = 300		
			<i>T. rubrum</i>	CMI = 150		
	Café molido descafeinado			<i>A. alternata</i>		CMI > 1415
				<i>A. fumigatus</i>		CMI > 1415
				<i>A. infectoria</i>		CMI > 1415
				<i>A. niger</i>		CMI > 1415
				<i>C. albicans</i>		CMI > 1415
				<i>C. glabrata</i>		CMI > 1415
				<i>C. krusei</i>		CMI = 44,22
				<i>C. parapsilosis</i>		CMI = 44,22
<i>F. oxysporum</i>	CMI > 1415					
<i>T. mentagrophytes</i>	CMI = 22,11					
<i>T. rubrum</i>	CMI = 22,11					
Arábica, China	Pulpa	Metanol 80%	<i>Alternaria brassicicola</i>	IC <sub>50</sub> = 90000	[46]	
			<i>Pestalotiopsis</i> sp.	IC <sub>50</sub> = 310000		
			<i>Paramyothecium breviseta</i>	IC <sub>50</sub> = 140000		
Arábica, México	Pergamino	Etanol:agua (1:1, v/v) aplicado como aditivo antifúngico en films de goma gellan	<i>Fusarium verticillioides</i>	PI = 56, a 8 mg·cm <sup>-2</sup>	[16]	
			<i>Fusarium</i> sp.	PI = 90, a 8 mg·cm <sup>-2</sup>		
			<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	PI = 92, a 8 mg·cm <sup>-2</sup>		

**Tabla 6 (cont).** Estudio de la actividad microbiana de los subproductos del café frente a diferentes patógenos.

Variedad, procedencia	Subproducto	Medio de extracción	Patógeno	Eficacia	Ref.
Muestras comerciales	Piel de plata	Etanol	<i>S. aureus</i>	CMI = 125–250	[47]
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CMI = 62,5	
			<i>E. coli</i>	CMI = 125	
			<i>K. pneumoniae</i>	CMI = 31,3	
			<i>P. aeruginosa</i>	CMI > 1000	
			<i>C. albicans</i>	CMI > 1000	
	Piel de plata	Etanol:agua (1:1, v/v)	<i>S. aureus</i>	CMI = 125–250	
			<i>S. epidermidis</i>	CMI = 62,5	
			<i>E. coli</i>	CMI = 125	
			<i>K. pneumoniae</i>	CMI = 31,3	
			<i>P. aeruginosa</i>	CMI > 1000	
			<i>C. albicans</i>	CMI > 1000	
Piel de plata	Agua	<i>S. aureus</i>	CMI = 31,3–250		
		<i>S. epidermidis</i>	CMI = 62,5		
		<i>E. coli</i>	CMI = 62,5–125		
		<i>K. pneumoniae</i>	CMI = 31,3		
		<i>P. aeruginosa</i>	CMI > 1000		
		<i>C. albicans</i>	CMI >1000		
Muestras comerciales	Piel de plata	Metanol 70%	<i>L. monocytogenes</i>	CMI = 3100	[48]
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CMI = 1600	
			<i>Cronobacter sakazakii</i>	CMI = 6300	
			<i>P. aeruginosa</i>	CMI = 3100	
			<i>Salmonella enterica</i>	CMI = 12500	
			<i>K. pneumoniae</i>	CMI = 3100	
	Piel de plata	Agua	<i>S. aureus</i>	CMI = 3100	
			<i>L. monocytogenes</i>	CMI = 6300	
			<i>V. parahaemolyticus</i>	CMI = 6300	
			<i>C. sakazakii</i>	CMI = 12500	
			<i>P. aeruginosa</i>	CMI = 12500	
			<i>S. enterica</i>	CMI = 12500	
Piel de plata	Agua	<i>K. pneumoniae</i>	CMI = 12500		
		<i>S. aureus</i>	CMI = 12500		

**Tabla 6 (cont).** Estudio de la actividad microbiana de los subproductos del café frente a diferentes patógenos.

Variedad, procedencia	Subproducto	Medio de extracción	Patógeno	Eficacia	Ref.
Arábica, Etiopía	Piel de plata	Metanol, agua, metanol:agua (1:1, v/v), o etanol:agua (3:1, v/v)	<i>S. aureus</i>	n.a. a 512 µg/mL	[49]
			<i>P. aeruginosa</i>	n.a. a 512 µg/mL	
			<i>E. coli</i>	n.a. a 512 µg/mL	
Arábica, Tailandia	Pulpa	Agua caliente	<i>S. aureus</i>	CMI = 37500	[50]
			<i>S. epidermidis</i>	CMI = 4690	
			<i>P. aeruginosa</i>	CMI = 75000	
			<i>E. coli</i>	CMI = 37500	

n.a. = no hay actividad a la mayor concentración estudiada, n.e.= no especificado, CMF = Concentración Mínima Fungicida (µg/mL), CMI = Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL), IC<sub>50</sub> = Concentración Inhibitoria Media (µg/mL), PI = Porcentaje de inhibición (%), ZI = Zona de Inhibición (mm).

## 2. OBJETIVOS

La hipótesis de partida de este Trabajo Fin de Máster es que los subproductos generados de la producción del café pueden ser una valiosa fuente de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas, susceptibles de aprovechamiento como una alternativa sostenible y natural a los fitosanitarios de síntesis convencionales para la protección de cultivos pre- o post-cosecha.

Siguiendo los principios de la economía circular, el objetivo general es la evaluación de la actividad antifúngica de los residuos generados por la industria cafetalera frente a patógenos que afectan al café como *F. xylarioides* o a los granos de café almacenados, como *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum*, para mejorar la sostenibilidad de la industria cafetalera.

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

1. Extraer y caracterizar los productos bioactivos presentes en diversos subproductos del café.
2. Evaluar la eficacia *in vitro* de tales compuestos bioactivos como fitosanitarios naturales frente a patógenos que afectan al café y/o a los granos de café almacenados, como *F. xylarioides*, *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum*, estableciendo las concentraciones mínimas inhibitorias respectivas.
3. Ensayar la efectividad del extracto más eficaz para la protección precosecha de la planta del café frente a la traqueomicosis por *F. xylarioides*, determinando la concentración para la que se produzca la completa inhibición.
4. Ensayar, para esa misma concentración del extracto propuesto, el grado de protección postcosecha para el grano de café frente a *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum*, a fin de asegurar, en condiciones controladas, la ausencia de micotoxinas.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Subproductos del café

Los subproductos de café arábica peruano —representativos del método de procesado en seco— han sido facilitados por Olam Agro Perú S.A.C. (Lima, Perú), concesionario de Olam International Limited (OFI). Por una parte, se ha obtenido la «cáscara» (exocarpio y parte del mesocarpio, resultado de un proceso de secado controlado) y, por otra, «grano en pergamino» (grano de café secado durante un periodo no superior a dos semanas y con una humedad inferior al 12%).

El pergamino ha sido separado manualmente, retirándolo del grano de café verde con piel de plata.

Dada la dificultad asociada a la separación manual de la piel de plata, se ha optado por adquirir piel de plata comercializada por Perk Environmental Ltd. (Maple Ridge, Columbia Británica, Canadá). Dicha piel de plata ha sido obtenida tras un proceso de tostado y molienda de café arábica procedente de agricultura ecológica.

### 3.2. Plantas y granos de café

Para los ensayos *in vivo*, las plantas de *C. arabica* han sido suministradas por IKEA (Valladolid, España). Para los ensayos *ex situ*, se han utilizado granos de café arábica suministrados por Seda Outspan Iberia S.L. (Palencia, España).

### 3.3. Reactivos y aislados fúngicos

El hidróxido de amonio, 50% v/v solución acuosa (nº CAS 1336-21-6), ha sido adquirido a Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EE.UU.). El ácido acético (80% en H<sub>2</sub>O; nº CAS 64-19-7) ha sido suministrado por Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, España); mientras que Becton, Dickinson

and Co. (Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) ha proporcionado el caldo de dextrosa de patata (PDB) y el agar de dextrosa de patata (PDA).

Los aislados fúngicos de *A. flavus* (MYC-1629) y *A. niger* (MYC-1600) nos han sido suministrados como subcultivos en PDA por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA; Zaragoza, España); mientras que *F. xylarioides* (DSM 62457) y *P. verrucosum* (DSM 1836) han sido adquiridos de la colección del Leibniz Institute DSMZ (Braunschweig, Alemania).

### 3.4. Proceso de extracción

El proceso de extracción ha sido similar al referido previamente por Sánchez-Hernández *et al.* [51]: se ha utilizado un ultrasonificador de tipo sonda (modelo UIP1000hdT; 1000 W, 20 kHz; Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemania) para sonicar la muestra de corteza durante 10 minutos en modo pulsado, con una pausa de 2 minutos después de cada 2,5 minutos de sonicación, y después se ha dejado reposar la muestra durante 24 horas. A continuación, se ha utilizado ácido acético para cambiar el pH a neutro. Tras 15 minutos de centrifugación de la solución a 9000 rpm, se ha filtrado el sobrenadante utilizando papel Whatman nº 1.

Para la liofilización de los extractos se ha utilizado un liofilizador LyoQuest-55 Plus (Azbil Telstar SLU, Barcelona, España).

### 3.5. Caracterización de los subproductos

Los espectros infrarrojos de los subproductos antes de realizar la extracción y de los extractos liofilizados se han registrado utilizando un espectrómetro de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) modelo Nicolet iS50 de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.), equipado con un sistema de reflexión total atenuada (ATR). Los espectros se han registrado en el intervalo 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución espectral de 1  $\text{cm}^{-1}$ , promediando 64 barridos.

Los extractos acuosos amoniacaes (neutralizados con ácido acético) de los subproductos se han analizado mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) en los Servicios de Apoyo a la Investigación (STI) de la Universidad de Alicante (Alicante, España), utilizando un cromatógrafo de gases modelo 7890A acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar modelo 5975C (ambos de Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Condiciones cromatográficas: volumen de inyección = 1  $\mu\text{L}$ ; temperatura del inyector = 280  $^{\circ}\text{C}$ , en modo *splitless*; temperatura inicial del horno = 60  $^{\circ}\text{C}$ , 2 minutos, seguida de una rampa de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  hasta una temperatura final de 300  $^{\circ}\text{C}$ , 15 minutos. La columna cromatográfica utilizada para la separación de los compuestos ha sido una Agilent Technologies HP-5MS UI de 30 m de longitud, 0,250 mm de diámetro y 0,25  $\mu\text{m}$  de película. Condiciones del espectrómetro de masas: temperatura de la fuente de impacto de electrones del espectrómetro de masas = 230  $^{\circ}\text{C}$  y del cuadrupolo = 150  $^{\circ}\text{C}$ ; energía de ionización = 70 eV. La identificación de los componentes se ha basado en la comparación de sus espectros de masas y sus tiempos de retención con los de los compuestos auténticos y en el cotejo informático con la base de datos del National Institute of Standard and Technique (NIST11).

### 3.6. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*

Para la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de los subproductos de café se ha empleado el método estándar EUCAST [52]. Se han incorporado soluciones de los extractos de los subproductos a un medio PDA para alcanzar concentraciones de entre 62,5 y 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se han transferido tapones de micelio fúngico de los márgenes de cultivos PDA de una semana de *F. xylarioides*, *A. flavus*, y *A. niger*, así como de un cultivo de dos semanas de *P. verrucosum*, a placas que contenían las concentraciones especificadas para cada tratamiento.

Se han seguido distintos periodos de tiempo para los distintos hongos, teniendo en cuenta que cada hongo tiene su propio ritmo de crecimiento. Se han preparado tres placas por combinación de tratamiento/concentración, con dos réplicas cada una. La incubación se ha realizado en condiciones específicas para cada hongo: las placas de *F. xylarioides*, *A. flavus*, y *A. niger* se han

incubado a 25 °C en la oscuridad durante una semana, y las de *P. verrucosum* durante dos semanas. El control no tratado ha consistido en medio PDA puro. El crecimiento radial del micelio se ha evaluado como la media de dos diámetros de colonia perpendiculares entre sí en cada repetición. La inhibición del crecimiento se ha determinado mediante la fórmula  $(d_c - d_t)/d_c \times 100$ , donde  $d_c$  y  $d_t$  representan el diámetro medio de las colonias del control no tratado y del hongo tratado, respectivamente.

### 3.7. Ensayos in planta

Plantas de *C. arabica* de al menos 80 días han sido empleadas en los experimentos *in vivo* para evaluar la eficacia del tratamiento *in vitro* más eficaz (es decir, el extracto de piel de plata) contra *F. xylarioides* inoculado artificialmente, siguiendo los métodos descritos en Sánchez-Hernández *et al.* [53] y González *et al.* [54], con pequeñas modificaciones. Se han utilizado múltiples macetas de 4×4 cm para cultivar las plantas con turba estéril como sustrato, con 15 plantas por tratamiento, realizándose dos repeticiones independientes. El tratamiento se ha aplicado a la CMI obtenida *in vitro* (62,5 µg/mL). Previamente, el hongo se ha cultivado en matraces de 250 mL que contenían PDB durante 7 días a 25 °C en la oscuridad con agitación constante. A continuación, las raíces de las plantas de café se han sumergido en una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios/mL durante 2 minutos, y las plantas se han transferido a macetas de plástico con sustrato estéril. Las plantas no inoculadas —sumergidas en agua esterilizada— se han utilizado como controles negativos. Todas las plantas se han incubado en una cámara de crecimiento (25 °C, fotoperiodo de 16/8 horas) durante 30 días.

### 3.8. Ensayos de protección de granos de café

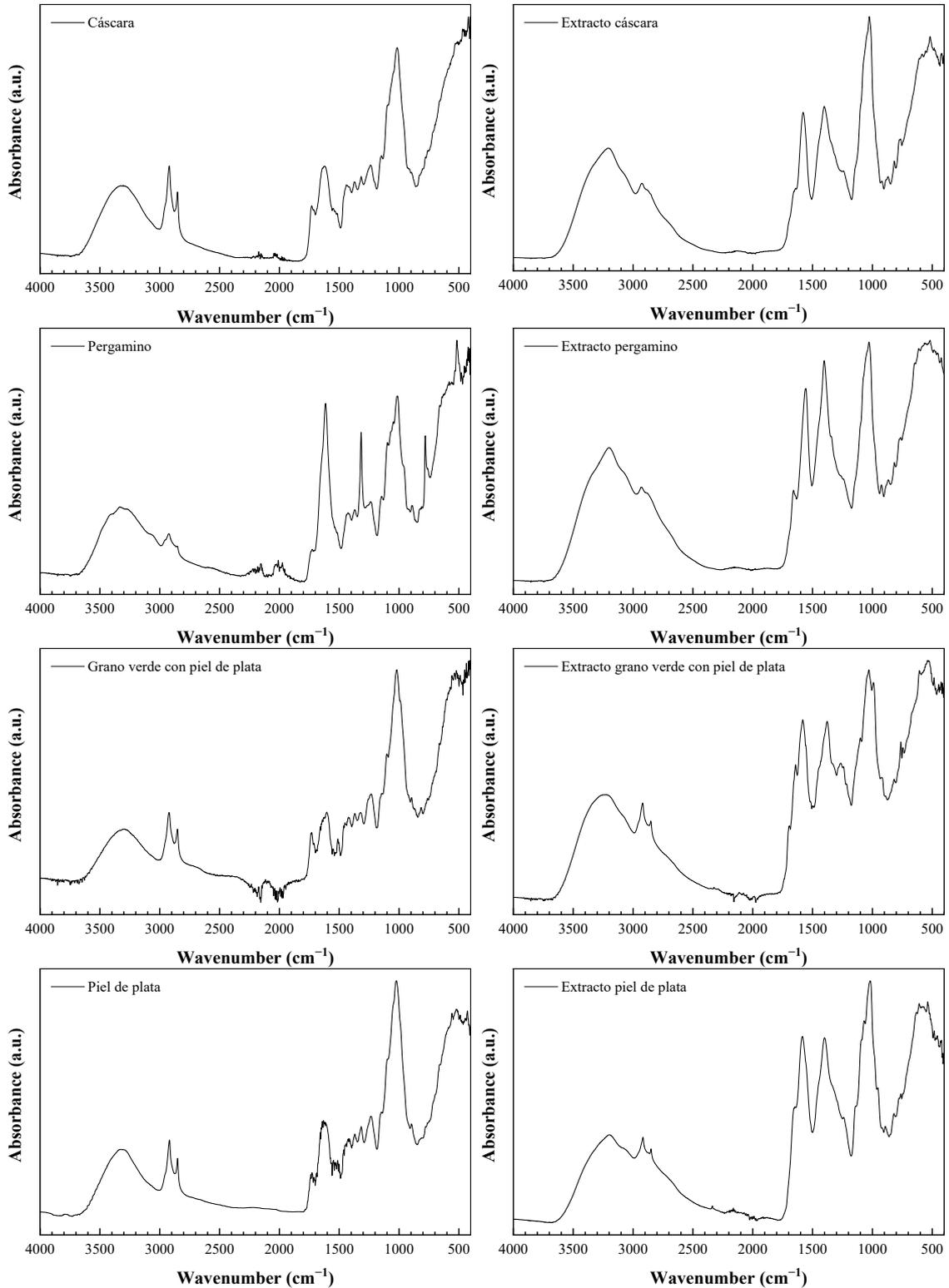
Las suspensiones de conidios de hongos se han preparado como se describe en Sánchez-Hernández *et al.* [55]. Se han obtenidos conidios de cultivos PDB de una semana de *F. xylarioides*, *A. flavus*, y *A. niger*, así como de un cultivo PDB de dos semanas de *P. verrucosum*. Tras filtración a través de dos capas de muselina estéril para eliminar los micelios somáticos, se ha determinado la concentración de esporas utilizando un hemocitómetro (Weber Scientific International Ltd., Teddington, Middlesex, Reino Unido) y se ha ajustado a  $1 \times 10^6$  esporas (conidios)/mL.

El efecto del extracto del subproducto de piel de plata sobre la protección de granos de café frente a *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum* se ha determinado según Sánchez-Hernández *et al.* [55], con ligeras modificaciones. Los granos se han esterilizado superficialmente por inmersión en hipoclorito sódico al 3% durante 2 minutos y luego se han enjuagado con agua mili-Q estéril tres veces, antes de secarlos a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar sobre papel absorbente estéril. Los tratamientos de los granos (50 g de granos de café por tratamiento) se han llevado a cabo por inmersión en 100 mL del extracto del subproducto de piel de plata (a una concentración equivalente a la 62,5 µg/mL, añadiendo 0,2% de Tween<sup>®</sup> 20) a temperatura ambiente, bajo agitación, durante 15 minutos. En los controles positivo y negativo se ha utilizado agua destilada con 0,2% de Tween<sup>®</sup> 20. Tras secado durante 30 minutos a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar, los granos se han inoculado con la suspensión de conidios (preparada como se describe en el párrafo anterior). A continuación, las muestras se han incubado en una cámara oscura a 25 °C durante 28 días. Cada tratamiento se ha repetido tres veces.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterización vibracional de los subproductos del café

En la Figura 8 se recogen los espectros infrarrojos de los residuos de café antes de realizar la extracción y de los liofilizados de los extractos; y, en la Figura 9, los correspondientes a los residuos de extracción de la piel de plata, húmedos y secados en estufa.



**Figura 8.** Espectros infrarrojos de los residuos de café antes de realizar la extracción y de los liofilizados de los extractos.



**Tabla 7.** Principales bandas de los espectros FTIR de los residuos de subproductos café y los extractos objeto de estudio (lío-filizados) con sus asignaciones. Los valores se recogen en  $\text{cm}^{-1}$ .

Cáscara (epicarpio) + pulpa inicial	Cáscara (epicarpio) + pulpa (lío-filizado)	Pergamino inicial	Pergamino (lío-filizado)	Grano + piel de plata inicial	Grano + piel de plata (lío-filizado)	Piel de plata inicial	Piel de plata (lío-filizado)	Residuos extractos piel de plata	Asignación
–	–	3330	–	3293	–	3332	–	3334–37	tensión O–H, enlace de hidrógeno
3306	3207	–	3202	–	3220	–	3201	–	tensión O–H, enlace de hidrógeno
2920	2926	2924	2930	2922	–	2918	2917	2917	tensión C–H (asimétrica). En cafeína: $2922 \text{ cm}^{-1}$
2851	–	–	–	2851	2851	2850	2850	2850	tensión C–H (simétrica). En cafeína: $2855 \text{ cm}^{-1}$
1730	–	1726	–	1730	1694	1727	–	–	ésteres (típica del ácido clorogénico)
1620	1641	1614	1659	1605	1642	1631	1650	1631	ésteres (típicas del ácido clorogénico)
1551	1579	–	1556	1551	1581	1547	1585	1551	amida II (típica de proteínas vegetales; acetamida)
1517	–	1518	–	1511	–	1513	–	–	típica del ácido clorogénico
1440	1402	1425	1402	1422	–	1415	1401	1420–22	deformación angular O–H del ác. quínico/ác. clorogénico
1372	–	1371	–	1370	1378	1370	–	1373	ésteres ácido clorogénico.
1316	–	1317	–	1320	–	1316	–	1317	flexión O–H (típica del ácido clorogénico)
1238	1241	1240	1242	1233	1241	1233	1240	1245	tensión enlaces C–O y C–C en carbohidratos (sacarosa)
1146	–	1146	–	1143	–	1147	–	1149	típica de ésteres (ácido clorogénico)
1093	–	1096	–	1095	1100	1097	–	1100	típica de carbohidratos y ácidos clorogénicos
–	–	–	–	–	–	–	1069	1053	deformación axial C–O del ácido quínico
1016	1026	1013	1028	1018	1029	1022	1018	1031	tensión C–O y C–C en carbohidratos (arabinogalactanos)
–	921	–	924	–	922	–	954	–	tensión C–C. Típica de amoniaco
–	–	893	867	895	–	897	892	–	deformación asimétrica de celulosa y hemicelulosa

## 4.2. Caracterización por GC-MS de los extractos de los subproductos del café

Los cromatogramas de los extractos amoniacales de los distintos subproductos del café se muestran en la Figura 12 (cáscara), Figura 13 (pergamino), Figura 14 (grano verde con piel de plata), y Figura 15 (piel de plata). Los principales compuestos identificados, junto con la bondad de las asignaciones (parámetro «Qual») se recogen en la Tabla 8, la Tabla 9, la Tabla 10 y la Tabla 11, respectivamente.

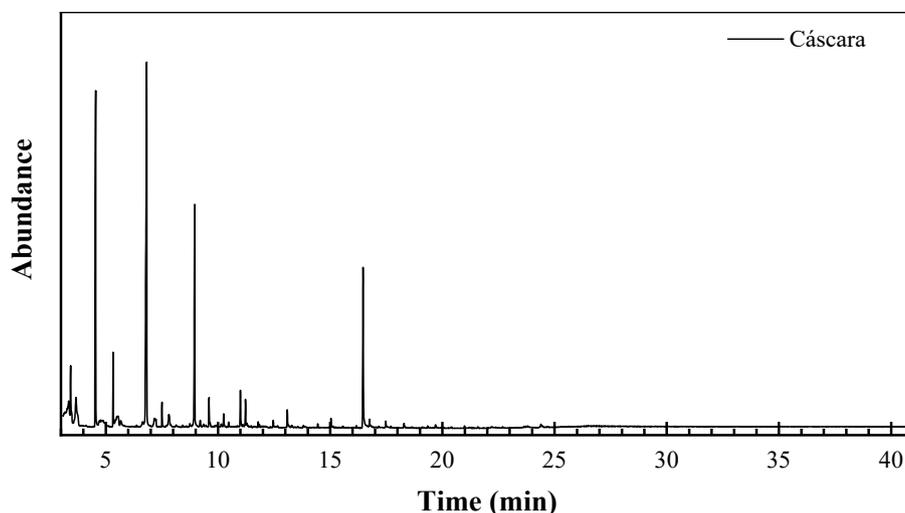


Figura 12. Cromatograma del extracto de cáscara (epicarpio)

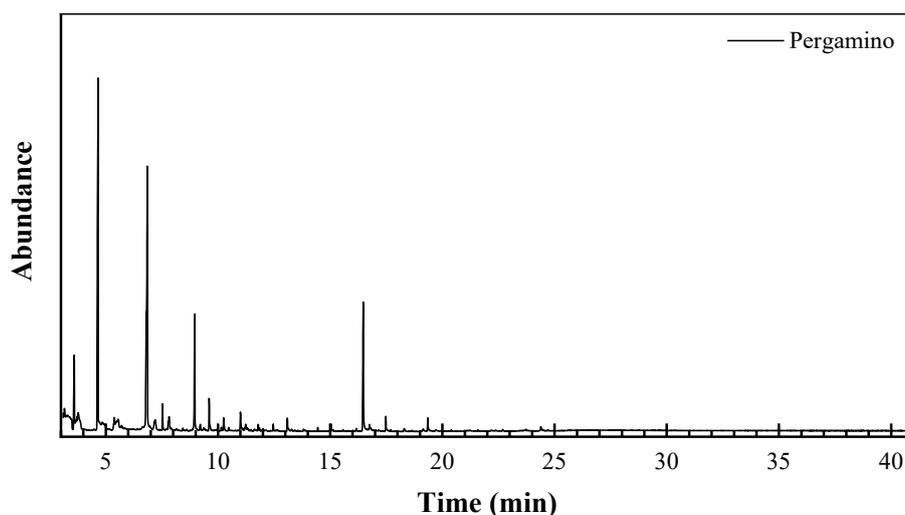
Tabla 8. Compuestos identificados en el extracto de cáscara, por orden de abundancia.

RT (min)	Área (%)	Compuesto	Qual
4,5468	41,0292	Oxime-, methoxy-phenyl-	91
16,4708	23,2021	Caffeine	97
5,3243	7,1184	N-Benzo[1,2,5]thiadiazol-5-yl-acetamide	53
3,4310	6,1758	Acetamide	72
5,5439	2,6277	4H-1,2,4-Triazole-3-thiol, 4-allyl-5-(1-naphthylmethyl)-	47
18,2930	2,1109	Benzenamine, N-[4-(1-methylethyl)benzylidene]-4-(1-pyrrolidylsulfonyl)-	93
15,0345	2,0348	Thiocyanic acid carbazol-3,6-diyl ester	42
5,4490	1,7880	7H-Dibenzo[b,g]carbazole, 7-methyl-	59
7,1583	1,6443	3-Hydroxymandelic acid, ethyl ester, di-TMS	47
9,2119	1,2369	1H-Indole, 1,3-dimethyl-5,6-dimethoxy-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-	38
17,4739	1,2129	n-Hexadecanoic acid	99
8,7431	0,8343	Dianhydromannitol	80
12,0015	0,7698	trans-4-(2-(5-Nitro-2-furyl)vinyl)-2-quinolinamine	49
11,3012	0,7696	1-Propylpentachlorotriphosphazene	38
8,1377	0,6605	Acridine-9-carbaldehyde	18
24,3944	0,6370	Acridine, 6,9-dichloro-2-methoxy-	43
9,3603	0,6264	4-(4-Chlorophenyl)-2,6-diphenylpyridine	35
24,4657	0,5338	2-Ethylacridine	41
19,3494	0,4490	Octadecanoic acid	93
10,8679	0,4162	1,2-Benzisothiazole-3-acetic acid, methyl ester	38
20,9876	0,4088	Acetamide, 2-[4-(1-oxo-3-phenyl-2-propenyl)phenoxy]-	35
11,4792	0,3925	1(3H)-Isobenzofuranone, 6-(dimethylamino)-3,3-bis[4-(dimethylamino)phenyl]-	58
10,1438	0,3874	3-(p-Ethoxyphenyl)-5-(O-tolylloxymethyl)-2-oxazolidone	22
6,3689	0,3505	5-Amino-3-methylpyrazole	35
13,2836	0,2912	7-Chloro-2,3-dihydro-3-(4-N,N-dimethylaminobenzylidene)-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin-2-one	58
12,0965	0,2894	2-p-Nitrophenyl-5-isopropoxy-oxadiazole-1,3,4	25
11,6039	0,2855	1H-Pyrrolo[2,3-b]pyridine-1-propionitrile, 2-phenyl-	20
7,7103	0,2602	Fluoren-9-ol, 3,6-dimethoxy-9-(2-phenylethynyl)-	11
12,6544	0,2321	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	64
4,4578	0,2182	Diethyl-1-(carb-n-butoxy)propylphosphonate	18

**Tabla 8 (cont.).** Compuestos identificados en el extracto de cáscara, por orden de abundancia.

RT (min)	Área (%)	Compuesto	Qual
15,2482	0,2148	5H-Cyclohepta[b]pyridine-3-carbonitrile, 6,7,8,9-tetrahydro-2-amino-4-(4-fluorophenyl)-	22
9,4672	0,2143	9H,11H-Pyrrolo[2,1-a]pyrido[3,4-b]indole-3-one, 1,2,3,5,6,11b-hexahydro-11b-methyl-	46
13,5566	0,1999	Benzothiazole, 2-[1-(2-phenylethyl)-2-benzimidazolymethylthio]-	38
11,9362	0,1764	2H-1,3,4-Benzotriazepine-2-thione, 5-benzyl-1,3-dihydro-3-methyl-	27
7,6688	0,1101	4-(Nonafluoro-tert-butyl) nitrobenzene	30
8,6956	0,0910	d-Glycero-d-galacto-heptose	37

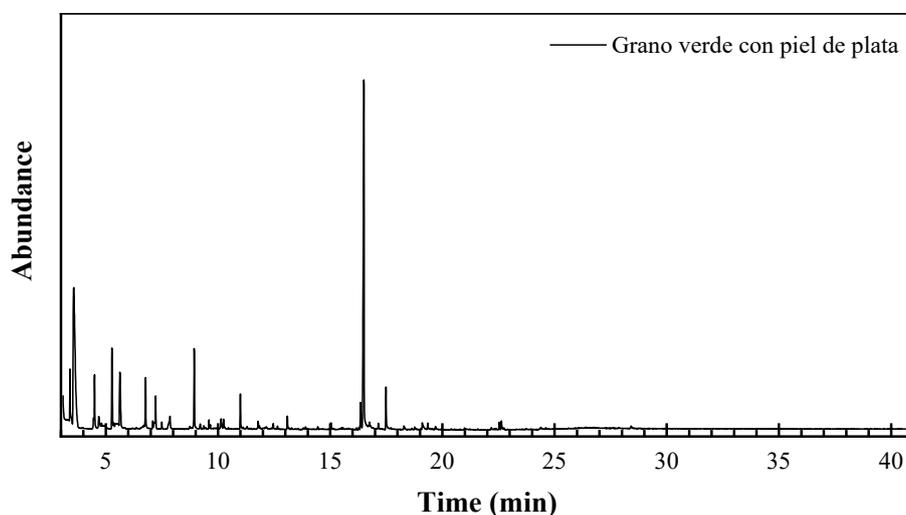
RT = tiempo de retención; Qual = bondad de la asignación.

**Figura 13.** Cromatograma del extracto de pergamino**Tabla 9.** Compuestos identificados en el extracto de pergamino, por orden de abundancia.

RT (min)	Área (%)	Compuesto	Qual
4,6538	49,6010	Oxime-, methoxy-phenyl_	91
16,4709	16,3147	Caffeine	97
3,5913	9,0384	Acetamide	91
7,5264	2,6147	Diethyl Phthalate	35
7,2059	2,5146	7H-Dibenzo(a,g)carbazole	25
5,3838	2,2901	Benzoic acid, 3-(acetylamino)-, methyl ester	43
19,3496	1,8900	Octadecanoic acid	99
17,4799	1,7474	n-Hexadecanoic acid	99
7,1644	1,5009	2-Hydrazino-4,6-dimethylpyrimidine	47
6,9507	1,4956	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-	43
9,2121	1,2452	Fluoren-9-ol, 3,6-dimethoxy-9-(2-phenylethynyl)-	38
16,7558	1,0108	2-Propen-1-one, 1-(4-aminophenyl)-3-phenyl-	38
11,2301	0,7900	Cannabichromene	50
11,7939	0,7230	trans-4-(2-(5-Nitro-2-furyl)vinyl)-2-quinolinamine	58
24,3946	0,7228	2-Propenoic acid, 2-cyano-3-(3-phenylphenyl)-, ethyl ester	47
16,8033	0,6515	Dibutanoylmorphine	38
4,7843	0,5793	Benzeneethenylamine, 3,4-dihydroxy-N-isopropyl-	25
18,2931	0,5690	Thiocyanic acid carbazol-3,6-diyl ester	25
9,3664	0,5672	(1H)Indolo[2,1-a]isoquinoline, 5,6,11,12-tetrahydro-2,3,8,9-tetramethoxy	38
19,1478	0,5461	Octadec-9-enoic acid	99
19,7116	0,4692	9-Amino-7-mercapto-5,6,8,10-tetraaza-benzo[b]fluoren-11-one	30
11,6278	0,4175	Cyheptamide	15
11,1173	0,4106	Bicyclo[4.1.0]hepta-2,4-diene, 2,3,4,5-tetraethyl-7,7-diphenyl-	43
11,1945	0,3796	Acetamide, N-9-phenanthrenyl-	27

**Tabla 9 (cont.).** Compuestos identificados en el extracto de pergamino, por orden de abundancia.

RT (min)	Área (%)	Compuesto	Qual
11,3429	0,2947	Thiophene-3-carboxylic acid, 4-(4-bromophenyl)-2-phenylthioacetyl-amino-, ethyl ester	25
10,8858	0,2460	2,4a-Oxymethano-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9-dodecahydrophenanthren-9-one, 8-cyanomethyl-2-methoxy-7-methoxycarbonyl-1,1,7-trimethyl-	22
16,7024	0,2439	10,11-Dihydro-5H-dibenzo(a,d)cycloheptene	38
13,4262	0,2070	1-Phenazinecarboxylic acid, 6-(1-hydroxyethyl)-, methyl ester	25
12,6546	0,1607	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	70
11,6812	0,1256	Cobalt, allyl-(pentamethylcyclopentadienyl)-	30
15,8121	0,1200	Quinoxaline, 2-methyl-3-phenyl-	35
13,3134	0,1166	5-Methyl-2-phenylindolizine	38
10,5416	0,1036	9H-Fluorene-4-carboxylic acid, 9-oxo-, phenethylamide	22
23,5399	0,1034	2-Ethylacridine	18
8,7847	0,1015	Benzaldehyde, 3,4-dimethyl-	35
8,8085	0,0877	Lysergamide	22



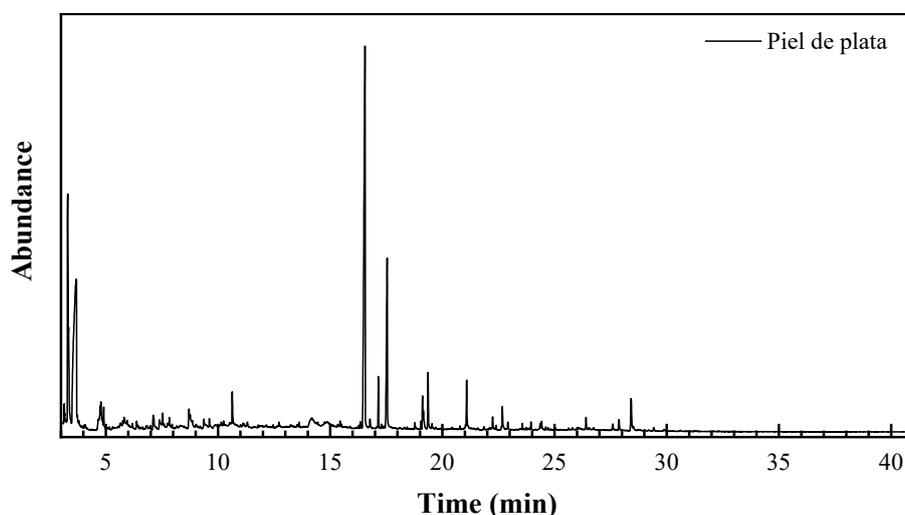
**Figura 14.** Cromatograma del extracto de grano verde con piel de plata.

**Tabla 10.** Compuestos identificados en el extracto de grano verde con piel de plata, por orden de abundancia.

RT (min)	Area (%)	Compuesto	Qual
16,5065	51,6872	Caffeine	97
5,2769	11,6934	Benzoic acid, 3-(acetylamino)-, methyl ester	50
4,4994	5,6561	Oxime-, methoxy-phenyl-	91
3,4013	4,5239	Acetamide	72
17,4917	4,1341	n-Hexadecanoic acid	99
16,3581	3,0333	2-Propenoic acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-, methyl ester	98
4,6893	2,5086	Edulan II	37
10,1438	1,6626	2-Methoxy-4-vinylphenol	76
6,6420	1,0705	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-	49
4,9683	1,0506	2-Anthracenamine	27
19,3495	0,9111	Octadecanoic acid	99
22,6377	0,9084	3-Chloro-8-methylthio-11H-indolo[3,2-c]quinoline	38
19,1477	0,8656	1,9-Tetradecadiene	96
9,2060	0,7524	4-(4-Chlorophenyl)-2,6-diphenylpyridine	47
22,5368	0,7279	Pterocarpin	86
19,1062	0,6552	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	99
12,1559	0,6406	Cyclopentane, 1-ethyl-2-methyl-, cis-	86
18,2930	0,5991	Benzenamine, N-[4-(1-methylethyl)benzylidene]-4-(1-pyrrolidylsulfonyl)-	92

**Tabla 10 (cont.).** Compuestos identificados en el extracto de grano verde con piel de plata, por orden de abundancia.

RT (min)	Area (%)	Compuesto	Qual
17,1475	0,5738	Hexadecanoic acid, methyl ester	97
9,6571	0,5308	trans-4-Dimethylamino-4'-methoxychalcone	30
6,1731	0,3957	N-Acetylisoxazolidine	27
8,7431	0,3910	Dianhydromannitol	53
11,1113	0,3109	7-Methoxy-2,3-diphenyl-4H-chromen-4-one	43
12,6545	0,3034	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	96
22,1806	0,2897	Demecolcine	18
14,4469	0,2781	Noradrenaline tetraTMS	47
6,3571	0,2686	Thiophen-2-methylamine, N-(2-fluorophenyl)-	35
24,3886	0,2677	Cobalt,(eta.<5>-2,4-cyclopentadien-1-yl)[(1,2,3,4,5,6-.eta.)-1-phenylboratabenzene]-	30
15,5153	0,2365	Dibutyl adipate	81
18,7678	0,2234	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	99
22,3943	0,2178	Methyl 20-methyl-heneicosanoate	93
8,8084	0,1984	Catechol	25
16,2809	0,1984	Cyclopentane, 1,2-dimethyl-3-(1-methylethenyl)-	60
9,8293	0,1980	4-(4-Methyl-[1,3,2]dioxaborinan-2-yloxy)-phenol	42
21,0767	0,1973	2-Ethylacridine	43
15,8120	0,1969	1',4'-Dioxo-6-phenyl-4-p-tolyl-1,4,6-triazanaphtho[2',3'-b]bicyclo[3.3.1]non-2-ene	9
13,2836	0,1933	7-Chloro-2,3-dihydro-3-(4-N,N-dimethylaminobenzylidene)-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin-2-one	50
19,9786	0,1859	Purine-2,6-dione, 8-(3-ethoxypropylamino)-1,3-dimethyl-3,9-dihydro-	35
22,3112	0,1659	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-	74
9,4375	0,1554	1-(2-Thienyl)ethanone semicarbazone ditms	16
19,5394	0,1501	9-Octadecenamide, (Z)-	49
8,6006	0,1218	Spiro[2H-indene-2,1'(2'H)-isoquinolin]-1(3H)-one, 3',4'-dihydro-3-hydroxy-7',8'-dimethoxy-	38
19,0468	0,1191	Heptadecanoic acid, 16-methyl-, methyl ester	97
18,8153	0,1187	cis-10-Heptadecenoic acid, methyl ester	92
24,6141	0,1140	Pyridine-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)-	38
11,4793	0,1113	1(3H)-Isobenzofuranone, 6-(dimethylamino)-3,3-bis[4-(dimethylamino)phenyl]-	46
20,5484	0,1063	4-(Acridin-9-ylamino)-butyric acid	38
20,7858	0,1010	Nonadecanoic acid, 10-methyl-, methyl ester	91

**Figura 15.** Cromatograma del extracto de piel de plata.

**Tabla 11.** Compuestos identificados en el extracto de piel de plata, por orden de abundancia.

RT (min)	Area (%)	Compuesto	Qual
16,5541	18,4879	Caffeine	97
3,6864	15,5270	Acetamide	87
3,3006	8,5300	N,N-Dimethylaminoethanol	91
17,5394	6,3647	n-Hexadecanoic acid	99
14,1800	1,8356	Quinic acid	35
19,3615	1,5363	Octadecanoic acid	99
8,7076	1,4923	Catechol	92
10,6366	1,4296	Pyridine, 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-, (S)-	96
21,0828	1,4203	Eicosanoic acid	99
17,1477	1,1807	Hexadecanoic acid, methyl ester	99
28,4129	1,1542	$\beta$ -Sitosterol	99
19,1538	1,1121	Oleic Acid	99
22,6794	0,8666	Docosanoic acid	99
11,3073	0,8420	Vanillin	95
19,1182	0,7454	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	99
14,8744	0,6734	$\alpha$ -Methyl mannofuranoside	46
14,2750	0,6628	Arginine	18
7,3960	0,6461	Methyl 2-furoate	64
4,9031	0,6183	2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-	83
5,8409	0,5839	Nanofin	47
9,8413	0,5660	Hydroquinone	70
16,7797	0,5359	2-Propenoic acid, 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-, methyl ester	99
3,1463	0,5350	1,2-Ethanediol	58
14,7557	0,5277	Decanoic acid, 3-methyl-	46
7,8352	0,5248	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	70
8,8560	0,5201	3-Amino-5-pyrazolol	38
21,4092	0,5019	E-8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate	51
5,9537	0,5003	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	50
27,8728	0,4848	Stigmasterol	97
10,5239	0,4729	$\alpha$ -[5-Methyl-2,3,4,5-tetrahydro-2-furyl]glucine	38
10,8384	0,4671	4-Chlorobutyric acid, 4-methoxy-2-methylbutyl ester	47
10,1440	0,4520	Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	58
7,5384	0,4448	Oxime-, methoxy-phenyl-	41
24,4243	0,4142	Thiazole, 4,5-dimethyl-2-(4-methylphenylsulfonilamino)-	95
19,5396	0,3983	9-Octadecenamide, (Z)-	93
22,2461	0,3975	Acetaldimine, $\alpha$ -(1-cyclohexen-1-yl)-N-(1-phenylethyl)-	25
15,3374	0,3889	4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	91
14,9160	0,3838	3-Methylmannoside	42
8,3159	0,3801	3,3-Bis(carbamino)diaziridine	35
4,8319	0,3790	Dimethyl sulfone	38
22,9227	0,3758	Octadecanamide	86
6,3751	0,3724	7-Tridecanone	27
8,4168	0,3689	Butanal, dimethylhydrazone	35
29,2023	0,3535	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-	49
16,3523	0,3478	2-Propenoic acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-, methyl ester	96
27,5938	0,3431	Campesterol	97
11,1174	0,3413	5-Isoxazolidinecarboxylic acid, 2-[2,3:5,6-bis-O-(1-methylethylidene)- $\alpha$ -D-mannofuranosyl]-3,5-dimethyl-, methyl ester, (3S-cis)-	37
26,0862	0,3399	2-Ethylacridine	59
23,9495	0,3387	4-[(Tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amino]-1-oxa-spiro[4.5]dec-3-en-2-one	15
13,6221	0,3381	Benzoic acid, 3,4-dimethoxy-, methyl ester	99
15,8894	0,3291	2-Cyclohexen-1-one, 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)-	60
13,9070	0,3265	N-Methyladrenaline, tri-TMS	27
15,4442	0,3251	Tetradecanoic acid	99
7,5918	0,3107	2(1H)-Pyridinone	25
17,2782	0,3106	Phosphinic acid, diphenyl-, methyl ester	78
14,6548	0,3050	Butanoic acid, 3-methyl-, 1-methylethyl ester	27
5,8172	0,3047	But-3-en-1-ynyl ethyl sulfide	27
13,0345	0,3019	3-Piperidinol, 1,4-dimethyl-, cis-	38
5,7578	0,2982	Erythritol	38

Tabla 11 (cont.). Compuestos identificados en el extracto de piel de plata, por orden de abundancia.

RT (min)	Area (%)	Compuesto	Qual
9,0222	0,2967	5-Hydroxymethylfurfural	64
6,1911	0,2934	1,2-Cyclopentanedione, 3-methyl-	80
10,3458	0,2916	Methoxyacetic acid, 4-methylpentyl ester	35
12,6606	0,2913	Trehalose	49
11,0046	0,2900	Cyclohexylamine, N-ethyl-	46
6,0605	0,2871	Diglycerol	47
15,1237	0,2863	1,6-Anhydro-2,3-dideoxy- $\beta$ -D-erythro-hexopyranose	18
12,1561	0,2838	Cyclodecane	49
9,9481	0,2806	4-(4-Methyl-[1,3,2]dioxaborinan-2-yloxy)-phenol	38
9,4911	0,2803	Naphthalene, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	30
8,1735	0,2758	Benzoic acid	25
10,5832	0,2698	Glycyl-L-Proline, N-dimethylaminomethylene-, methyl ester	35
19,0410	0,2646	Methyl stearate	99
16,2752	0,2634	Bicyclo[10.8.0]eicosane, cis-	42
15,0584	0,2608	2-Nonenoic acid, methyl ester	43
17,3851	0,2595	L-Proline, N-valeryl-, undecyl ester	43
10,0847	0,2520	Pentanoic acid, 2-ethylcyclohexyl ester	35
14,3937	0,2477	D-Glucuronic acid, $\gamma$ -lactone	38
26,7450	0,2443	Vitamin E	96
18,3110	0,2416	1-(Methylamino)anthraquinone	51
14,9991	0,2341	Methyl(methyl 4-O-methyl- $\alpha$ -d-mannopyranoside)uronate	43
15,8063	0,2304	2-Decenoic acid, methyl ester	41
18,8155	0,2239	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	99
23,5637	0,2231	Octocrylene	64
15,5155	0,2212	Dibutyl adipate	64
7,9539	0,2200	1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinone	38
21,8544	0,2189	1H-1,4-Diazepine-5,7(2H,6H)-dione, 6,6-diethyldihydro-2,2-dimethyl-	25
15,6935	0,2169	2-Hydrazino-4-(1,1-ethylenedioxyethyl)tropone	46
22,3945	0,2049	Docosanoic acid, methyl ester	97
18,7680	0,2048	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	99
18,4356	0,2034	Heptadecanoic acid	91
12,9395	0,2009	3,7-Benzofurandiol, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-	46
13,4678	0,1886	Dehydroacetic Acid	15
15,5926	0,1801	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside	30
19,6998	0,1799	2-Chloro-6-methoxyquinoline-4-carboxylic acid	42
29,4219	0,1754	Stigmasta-4,6,22-trien-3 $\beta$ -ol	25
12,1205	0,1736	Adenosine, 1,2-dihydro-2-oxo-	38
20,4477	0,1729	S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]N,N-dimethylcarbamoyl thiocarbohydroximate	64
12,7674	0,1713	Benzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-, methyl ester	90
13,2185	0,1695	Dodecanoic acid	95
11,8593	0,1674	2,2'-Bipyridine	74
12,2985	0,1658	Benzaldehyde, 3,4-dimethoxy-	50
16,7144	0,1633	1,19-Eicosadiene	49
12,0077	0,1624	trans-4-(2-(5-Nitro-2-furyl)vinyl)-2-quinolinamine	49
23,4509	0,1616	9,10-Anthracenedione, 1,2,5,8-tetrahydroxy-	56
6,4404	0,1614	Piperazine, 2-methyl-	47
20,7860	0,1613	Methyl 18-methylnonadecanoate	99
19,5989	0,1595	Methyl 9,12-heptadecadienoate	97
5,0752	0,1592	Thiourea, dimethylaminomethyl	38
17,0646	0,1587	3,4-Dimethoxycinnamic acid	90
12,5537	0,1580	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one, 6,6-dimethyl-2-(2-oxopropyl)-, isomer 2	22
21,0353	0,1575	Dihexadecyl phosphate	38
13,3194	0,1571	2-Furancarboxylic acid, 5-(2-methylpropyl)-4-(4-morpholinylmethyl)-	62
16,1268	0,1570	Pentadecanoic acid, methyl ester	91
15,6460	0,1569	4-Benzylphenylacetone nitrile	25
6,9211	0,1557	3-Cyclohexen-1-carboxaldehyde, 3-methyl-	25
8,3753	0,1447	2-Amino-8-[3-d-ribofuranosyl]imidazo[1,2-a]-s-triazin-4-one	55
6,9924	0,1443	Hydrouracil, 1-methyl-	27
24,6143	0,1440	Supraene	90

**Tabla 11 (cont.).** Compuestos identificados en el extracto de piel de plata, por orden de abundancia.

RT (min)	Area (%)	Compuesto	Qual
20,8869	0,1426	1-Eicosene	42
25,0535	0,1416	Eicosane	90
22,1808	0,1404	2-Amino-10-oxo-10H-9-oxa-1-aza-anthracene-3-carbonitrile	44
24,1632	0,1395	Indole-2-one, 2,3-dihydro-N-hydroxy-4-methoxy-3,3-dimethyl-	42
26,5551	0,1384	2,4-Cyclohexadien-1-one, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-	38
7,4969	0,1366	4-Pyridinol	41
13,3966	0,1362	2-Hexene, 1,1-diethoxy-	55
9,4555	0,1338	Valeraldehyde, dimethylhydrazone	49
11,9602	0,1315	1,3,3-Trimethyl-1-(4'-methoxyphenyl)-6-methoxyindane	22
12,4054	0,1299	Benzenethiol, 4-(1,1-dimethylethyl)-	64
22,3114	0,1291	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-5-methyl-	41
20,1450	0,1283	5,9-Dimethyl-2-(1-methylethylidene)-1-cyclodecanol	45
4,0900	0,1278	Thiophene, tetrahydro-	35
9,1291	0,1263	N-Ethoxy-2-carbaminoaziridine	49
19,9016	0,1256	2(1H)-Naphthalenone, octahydro-4a-methyl-7-(1-methylethyl)-, (4a $\alpha$ ,7 $\beta$ ,8a $\beta$ )-	94
8,9629	0,1232	2-Butyl-1,2-oxaborolane	30
22,0977	0,1223	1-Benzazirene-1-carboxylic acid, 2,2,5a-trimethyl-1a-[3-oxo-1-butenyl]perhydro-, methyl ester	20
22,0087	0,1205	1-Tetradecanamine	25
11,9246	0,1197	2-Acetylthiazole	18
9,0935	0,1196	Cyclohexanol, 1,3-dimethyl-, cis-	38
26,0091	0,1187	2-Methyl-7-phenylindole	38
18,1151	0,1177	Methyl 10-methyl-hexadecanoate	50
11,6634	0,1161	Methyl 6-oxoheptanoate	35
10,3280	0,1124	Heptane, 3-methyl-	25
6,5294	0,1117	Butanoic acid, 3-amino-	47
16,9103	0,1113	Dibenz[c,e]oxepin	25
23,8842	0,1100	Tetracosanoic acid, methyl ester	93
13,1769	0,1079	5 $\alpha$ -Cholestan-2-one, oxime	25
14,7854	0,1054	3-Deoxy-d-mannitol	38
7,2476	0,1038	Fumaric acid, monoamide, N,N-dimethyl-, 4-chloro-3-methylphenyl ester	45
23,8130	0,1009	4H-Pyran-3-carboxylic acid, 2-amino-5-cyano-6-ethyl-4-(3-pyridinyl)-, methyl ester	43
23,6528	0,1006	Tricyclo[10.2.2.2(5,8)]octadeca-5,7,12,14,15,17-hexaene, 6-nitro-	60
13,3728	0,1004	d-Mannitol, 1-O-(22-hydroxydocosyl)-	30
6,6481	0,0995	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	81
5,1702	0,0993	2-Hexene, 1-methoxy-, (E)-	53
28,7156	0,0993	1H-Indole, 1-methyl-2-phenyl-	43
22,6378	0,0990	2,4-Imidazolidinedithione, 1-methyl-5,5-diphenyl-	41
24,8398	0,0983	4-Quinolinecarboxylic acid, 2-chloro-	42
12,3697	0,0978	Methyl 2-tetradecyloxiranecarboxylate	25
20,2281	0,0957	Spiro[5.6]dodecane-1,7-dione	74
5,7163	0,0939	2-Deoxyribose diisopropylmercaptal	27
20,5901	0,0936	Methyl 9-heptadecenoate or 9-17:1	53
20,3468	0,0934	11-Hexadecenoic acid, 15-methyl-, methyl ester	44
20,7088	0,0930	Butyl 9-tetradecenoate	45
11,8890	0,0919	Oxazole-4-carboxylic acid, 2-methyl-	22
13,1295	0,0902	Ethyl N-isopropyl-3-phenylpropanimidate	42
7,2950	0,0881	Propanamide, N,N-dimethyl-	25
11,6397	0,0878	4-Oxopentyl formate	56
20,6258	0,0867	cis-10-Heptadecenoic acid, methyl ester	47
4,1672	0,0837	Methanaminium, 1-carboxy-N,N,N-trimethyl-, hydroxide, inner salt	53
6,7253	0,0747	Acetic acid, sodium salt	22
8,0963	0,0747	2R,3S-1-[1,3,4-Trihydroxy-2-butoxymethyl]uracil	37
18,9342	0,0741	Benzaldehyde, 2-nitro-, diaminomethylidenhydrazone	38
23,3916	0,0715	Sarcosine, N-(cyclopentylcarbonyl)-, nonyl ester	46
4,0425	0,0705	Dimethyl Sulfoxide	90
6,6066	0,0635	1,2,3,4-Butanetetrol, [S-(R*,R*)]-	22

### 4.3. Actividad antifúngica de los extractos de los subproductos del café

#### 4.3.1. Actividad *in vitro*

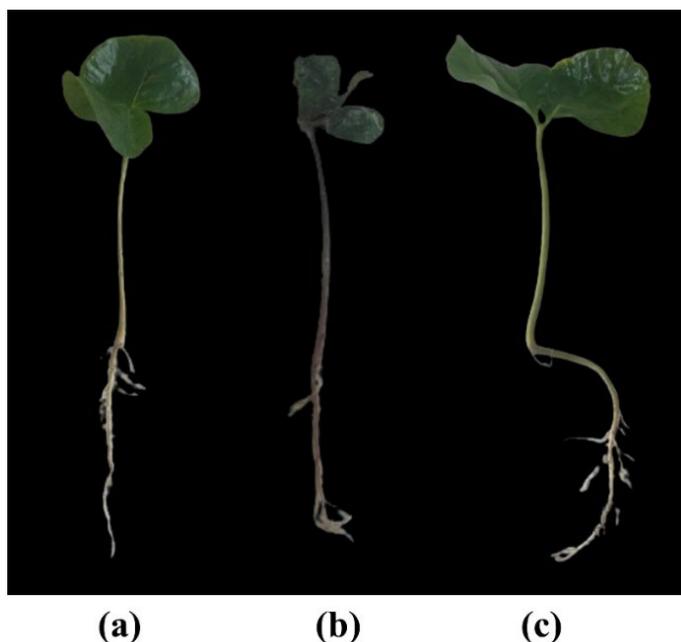
Los resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias (en  $\mu\text{g/mL}$ ) referidas a la prueba de susceptibilidad antifúngica para cada uno de los subproductos del café se representan en la Tabla 12. En todos los casos, la piel de plata ha sido la que mayor efectividad ha mostrado, con valores de inhibición, en el caso de *A. flavus* y *F. xylarioides*, de 31,2 y 15,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente; y de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  para *A. niger* y *P. verrucosum*. Por el contrario, el extracto de cáscara de café ha sido el que menor actividad antifúngica ha proporcionado, con valores de inhibición de 375-1500  $\mu\text{g/mL}$ , elevados si comparamos con los resultados obtenidos para la piel de plata.

**Tabla 12.** Valores de concentraciones mínimas inhibitorias (en  $\mu\text{g/mL}$ ) contra *F. xylarioides*, *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum* obtenidos para cada uno de los subproductos del café.

Subproducto	<i>F. xylarioides</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. verrucosum</i>
Cáscara	375	1000	1000	1500
Pergamino	250	750	750	1000
Grano verde + piel de plata	125	250	375	500
Piel de plata	15,6	31,2	62,5	62,5

#### 4.3.2. Ensayos *in planta*

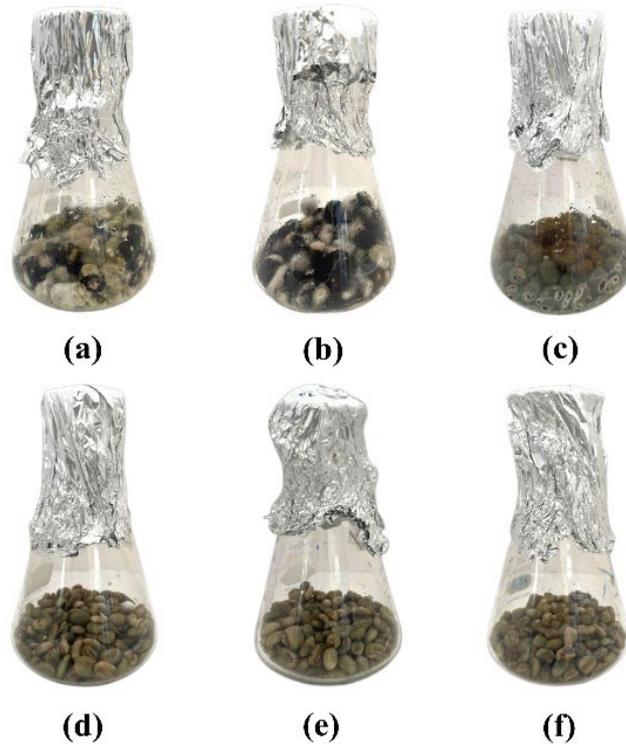
La Figura 16 muestra los resultados obtenidos en plantas de cafeto tratadas con el extracto de piel de plata. Todas las plantas del control positivo (plantas inoculadas artificialmente y tratadas sólo con agua bidestilada) han mostrado síntomas típicos de traqueomicosis del cafeto causada por *F. xylarioides* como la pudrición o necrosis de la raíz pivotante y la parte basal del tallo, lo que las hacía fáciles de arrancar al finalizar el ensayo. A medida que la enfermedad avanzaba, las hojas se ennegrecían, rizaban y marchitaban, llevando finalmente al colapso de toda la planta (Figura 16b). En contraste, las plantas tratadas con el extracto de piel de plata (Figura 16c) a una concentración de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  no han presentado síntomas de marchitez ni pudrición de la raíz, y no han mostrado signos de fitotoxicidad, resultando similares a las plantas del control negativo (Figura 16a).



**Figura 16.** Síntomas de la traqueomicosis del cafeto causada por *F. xylarioides* en plantas de *C. arabica* tras 30 días de inoculación: (a) control negativo; (b) control positivo; (c) extracto de piel de plata a 62,5  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.3.3. Protección de granos de café

Para evaluar la eficacia del extracto de piel de plata en la protección postcosecha de granos de café, favoreciendo su almacenabilidad y seguridad alimentaria, se han realizado ensayos *ex situ* contra *A. flavus* (Figura 17a y d), *A. niger* (Figura 17b y e), y *P. verrucosum* (Figura 17c y f). Tras 28 días de incubación, en muestras de grano de café infectadas artificialmente con cada patógeno, no se ha observado desarrollo micelial en los granos tratados con extracto de piel de plata a una concentración de 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que los granos de control positivo (inoculados y tratados sólo con agua destilada) han exhibido una clara colonización fúngica (Figura 18). Por tanto, el tratamiento ha mostrado un claro efecto protector tanto en granos almacenados de café expuestos a los patógenos.



**Figura 17.** Ensayo de protección postcosecha. Granos de café no tratados inoculados artificialmente con (a) *A. niger*, (b) *A. flavus*, y (c) *P. verrucosum*. Efecto de la aplicación de extracto de piel de plata a una concentración de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  para cada patógeno en granos de café sobre el crecimiento de (d) *A. niger*, (e) *A. flavus*, y (f) *P. verrucosum*. Sólo se muestra una réplica por tratamiento.



**Figura 18.** Detalle de los granos de café inoculados con *A. niger*, *A. flavus* y *P. verrucosum*: (arriba) no tratados; (abajo) tratados con extracto de piel de plata a una concentración de 62,5  $\mu\text{g/mL}$ . Solo se muestra una réplica por tratamiento.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Composición química de los subproductos del café

Componentes principales de los extractos estudiados son: cafeína, acetamida, y ácido n-hexadecanoico (Tabla 11). Un componente principal, adicional, en los extractos de cáscara y pergamino, es la metoxifeniloxima; y un componente fundamental del extracto de piel de plata, el ácido quínico. La identificación de estos componentes es enteramente acorde con las asignaciones a grupos funcionales característicos (especialmente de cafeína y ácido quínico) por espectroscopía infrarroja (Tabla 7).

**Tabla 13.** Secuencia de componentes por abundancia relativa.

Subproducto	Principales constituyentes del extracto amoniactal
Cáscara (epicarpio)	Metoxi-feniloxima > cafeína > N-benzo[1,2,5]tiadiazol-5-il-acetamida y acetamida
Pergamino	Metoxi-feniloxima > cafeína > acetamida > ácido n-hexadecanoico
Grano verde con piel de plata	Cafeína > metoxi-feniloxima > acetamida > ácido n-hexadecanoico
Piel de plata	Cafeína > acetamida > ácido n-hexadecanoico > ácido quínico

El elevado porcentaje en cafeína en el liofilizado del extracto de granos de café defectuosos (52%) y los muy significativos porcentajes de este componente en los liofilizados de los extractos de cáscara (23%), pergamino (16%), y piel de plata (18.5%), acreditan el procedimiento de extracción propuesto como extraordinariamente rentable para la recuperación de los subproductos del café, más en cuanto el precio de la cafeína ya alcanza los 133 €/kg. Además, la riqueza en cafeína obtenida al trabajar en medio amoniactal sigue la misma secuencia que la referida por Machado *et al.* [57] para extractos hidrometanólicos: granos defectuosos (1,4%) > pulpa (0,85%) > piel de plata (0,71%) > pergamino (0,06%). Los contenidos de cafeína también fueron mayores que los recogidos en el artículo de revisión de Lee *et al.* [6]: 0,8–4% para granos de café verdes, 0,8–5,7% para la pulpa, 0,5–2% para la cáscara, y 0–1,4% para piel de plata; o que los referidos por Rebollo-Hernanz *et al.* [10]: 6,8–12% para la cáscara, 2–10,1% para la pulpa, 0,1–1,3% para el pergamino, y 0,7–9,5% para la piel de plata.

La presencia en los extractos de metoxi-feniloxima (componente al que se suele adscribir el perfil de aroma y sabor del café) debe ser relacionada con la temperatura y duración del calentamiento durante el procesado. En el caso de la acetamida (un componente identificado tanto en el café tostado como en el instantáneo), su ubicua presencia en los extractos ha de ser referida a una amonólisis de ésteres de acetato. En el mismo contexto, el ácido n-hexadecanoico podría ser referido a los cambios químicos que ocurren en el proceso de obtención de los extractos.

El enriquecimiento en ácido quínico (asociado con el amargor y la astringencia del café recalentado) observado en el extracto de la piel de plata puede deberse a la sobreexposición al calor del ácido clorogénico (o sus isómeros los ácidos cafeoilquínicos) o a su hidrólisis en medio amoniactal (equivalente a la observada para los granos de café verdes, con la presencia del éster metílico del ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico como producto de ruptura). A pesar de su muy elevado precio en el mercado (entre 1120 €/kg y 2640 €/kg), y su presencia en la piel de plata (1,85%) en un porcentaje similar a la de cafeína en el grano de café (1,5% en café arábica y 2,5% en café robusta), el hecho de que esta película sea la fracción residual con menos entidad (lo que hace tediosa su separación de otras fracciones), confiere solo moderadas expectativas a su potencial recuperación. A efectos comparativos, en el estudio de Machado *et al.* [57] para extractos hidrometanólicos, la presencia de ácidos cafeoilquínicos en la piel de plata fue muy inferior (79,7 mg/100 g, es decir, 0,08%), alcanzando para los granos defectuosos (en los que el contenido fue el más alto) un 4,88%.

La no aparición directa de melanoidinas en el listado de compuestos identificados por GC–MS para el extracto de piel de plata debe atribuirse a su complejidad y su elevado peso molecular, ya que suelen ser demasiado grandes y poco volátiles para esta técnica. Sin embargo, se observan compuestos estructuralmente análogos a las melanoidinas o que podrían ser fragmentos de las

melanoidinas, como compuestos que contienen nitrógeno, furanos y pirroles, compuestos fenólicos, y compuestos carbonílicos. Del listado de compuestos recogidos en la Tabla 11, podemos considerar los siguientes compuestos potencialmente relacionados o estructuralmente análogos a las melanoidinas: N,N-dimetilaminoetanol, (S)-3-(1-metil-2-pirrolidinil)-piridina, y 2(1H)-piridinona por tratarse de carbonitrogenados; los compuestos fenólicos catecol y vainillina, susceptibles de incorporación a las estructuras de las melanoidinas; la cetona cíclica 2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona y la dicetona cíclica 3-metil-1,2-ciclopentanediona, que pudieran estar implicadas en la formación de melanoidinas; el compuesto heterocíclico 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona, como fragmento de las melanoidinas; el compuesto heterocíclico nitrogenado 1H-pirrol-2-carboxaldehído, similar a las melanoidinas; y el 5-hidroximetilfurfural, un derivado furánico asociado a la reacción de Maillard y la formación de melanoidinas. La presencia de estos compuestos, aunque no sea concluyente, sugiere que el extracto de piel de plata contiene productos de la reacción de Maillard, lo que sería coherente con la presencia de melanoidinas en la muestra original.

## 5.2. Actividad antifúngica

### 5.2.1. Presencia de constituyentes con actividad antifúngica

Tomando como referencia el extracto más eficaz (es decir, el de piel de plata) y los compuestos con abundancias superiores al 0,8%, la actividad antifúngica observada ha de referirse principalmente a la presencia de cafeína, con propiedades antifúngicas y antimicrobianas [58]; ácido n-hexadecanoico (ácido palmítico) y éster metílico, conocidos por su actividad antimicrobiana [59,60]; ácido quínico, que demuestra actividad antifúngica y antimicrobiana [61,62]; ácido octadecanoico (ácido esteárico), que posee propiedades antimicrobianas [63]; catecol, que muestra efectos tanto antibacterianos como antifúngicos [64]; ácido eicosanoico (ácido araquídico), que muestra actividad antifúngica [65];  $\beta$ -sitosterol, con propiedades tanto antifúngicas como antibacterianas [66]; ácido oleico, que exhibe propiedades antimicrobianas [63]; y vainillina, con actividad antifúngica [67].

### 5.2.2. Mecanismo de actuación

Dado que la cafeína es el componente más abundante de entre los referidos en el apartado anterior, resulta apropiado comentar su mecanismo de actuación como agente antifúngico. Las metilxantinas en general presentan una interesante actividad antifúngica, ya que inhiben las quitinasas fúngicas necesarias para la remodelación de la pared celular fúngica y la replicación celular [68], y varios estudios han propuesto la cafeína como una alternativa ecológica, segura y asequible a los biocidas convencionales para la protección de la madera [69-71].

En cuanto a su modo de acción, es sabido que la cafeína actúa de dos maneras contra los hongos: en primer lugar, suprimiendo directamente el crecimiento y, en segundo lugar, promoviendo el micoparasitismo de especies antagonistas [72]. En cuanto al primer mecanismo, Reinke *et al.* [73] informaron de que la acción fungicida de la cafeína se basaba en dañar la membrana citoplasmática de la levadura durante las primeras etapas de formación. Wang *et al.* [74] analizaron *in vitro* los mecanismos antifúngicos de la cafeína frente a *Colletotrichum fructicola*, estudiando sus efectos sobre la morfología del micelio, la pared celular y la membrana plasmática. Descubrieron que la cafeína ejercía sus efectos antifúngicos a través del daño a las paredes y membranas celulares, lo que en última instancia conducía a la inhibición del crecimiento o a la muerte del patógeno, y que también se veían afectadas las actividades del aldehído dicarboxílico metano (MDA) y de la superóxido dismutasa (SOD) en las hifas.

La mayor eficacia de los extractos de piel de plata frente a los del resto de subproductos deben atribuirse no solo al contenido en cafeína, sino, a la presencia concurrente de otras especies con actividad antimicrobiana y modos de acción potencialmente complementarios, que generaría sinergismo. Dicho comportamiento sinérgico ya ha sido referido por otros autores para la cafeína con otros productos antifúngicos [75]. No debe tampoco excluirse la posible presencia de melanoidinas resultantes del proceso de tostado. Por ejemplo, Jiménez-Zamora *et al.* [76] han

referido que la presencia de melanoidinas del café ejerce una intensa actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas en productos alimenticios, atribuible a su capacidad quelante. La presencia combinada de cafeína y melanoidinas debería también contribuir al efecto sinérgico observado.

### 5.2.3. Comparativa con las eficacias referidas en la bibliografía

Aunque las comparaciones de eficacias con otros patógenos deben ser tomadas con precaución, pues la susceptibilidad varía en función del patógeno, es destacable que las CMI referidas en la bibliografía (Tabla 6) para los extractos de posos, pulpa, mucílago, granos verdes, café tostado, y café molido son habitualmente del orden de miles o decenas de miles de  $\mu\text{g/mL}$ , es decir, muy superiores a las referidas en este trabajo. En cuanto a los resultados para extractos de piel de plata, son dispares: en algunos casos se refieren actividades comparables a las de los otros subproductos [48,49], mientras que en otros son muy superiores [47]. De hecho, en el estudio de Rodrigues *et al.* [47] se recogen valores de CMI de tan solo 31,3  $\mu\text{g/mL}$  para los extractos etanólicos, hidroetanólicos y acuosos de piel de plata frente a algunos patógenos, similares a los observados en nuestro caso.

Si nos centramos en las investigaciones en que se ha trabajado con los mismos patógenos que en este estudio, destaca el trabajo de Farouk *et al.* [44], en que se emplearon extractos hidrometanólicos de posos de café frente a *Aspergillus* sp., incluyendo *A. flavus*. Las concentraciones mínimas inhibitorias, en el rango de 380–460  $\mu\text{g/mL}$  (siendo el valor más alto el correspondiente a *A. flavus*) son mejores que las obtenidas en nuestro caso para los extractos de cáscara y pergamino (1000 y 750  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), pero peores que las del extracto de grano verde (250  $\mu\text{g/mL}$ ) y de piel de plata (31,2  $\mu\text{g/mL}$ ).

Por otra parte, en el trabajo de Calheiros *et al.* [45] sobre extractos hidroetanólicos de posos de café y café molido frente a *A. niger* y *Fusarium oxysporum*, se refieren CMI superiores a 1100  $\mu\text{g/mL}$  en el caso de los posos y superiores a 1770  $\mu\text{g/mL}$  para el café molido. En el mismo estudio, al trabajar con extractos de café descafeinado molido y de posos de café descafeinado, los valores de CMI frente a ambos patógenos fueron superiores a 1415  $\mu\text{g/mL}$  para el café molido y superiores a 2400  $\mu\text{g/mL}$  para los posos. A efectos comparativos, las CMI para *A. niger* y *F. xylarioides* en este TFM han sido de 62,5–1000 y 15,6–375  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

En cuanto al estudio de Mirón-Mérida *et al.* [16], en que se ensayaron extractos hidroetanólicos de pergamino como aditivos antifúngicos en *films* de goma gellan frente a *Fusarium* sp., los autores refieren que se observó inhibición parcial del crecimiento a valores de 8  $\text{mg/cm}^2$ , pero tal valor no es comparable directamente con los valores de CMI, al no seguirse una metodología estándar.

### 5.3. Limitaciones del estudio y perspectivas futuras

Dados los problemas referidos para la detección de melanoidinas mediante GC–MS en el extracto de piel de plata, sería preciso repetir su caracterización por GC–MS tras un proceso de derivatización, o bien recurrir al uso de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), más idónea para compuestos de alto peso molecular y menos volátiles, pudiéndose usar ionización por electrospray (ESI) para moléculas grandes.

Entre las perspectivas a corto plazo que se están considerando, la primera es la tramitación de la patente de utilidad para el procedimiento de recuperación propuesto para los residuos del café, a la vista de su alta rentabilidad (pendiente de objetivar con un estudio económico exhaustivo) y la publicación de los resultados de eficacia *in vitro*, *in planta* y *ex situ* para los tratamientos antifúngicos.

## 6. CONCLUSIONES

1. El método propuesto para la recuperación de los residuos de café (como liofilizados tras extracción en medio amoniacal) se ha mostrado extraordinariamente rentable para la producción de cafeína, y competitivo frente a los métodos utilizados en la actualidad. La razón ha de buscarse en que la solubilidad de la cafeína en amoniaco es varios órdenes de magnitud que en dióxido de carbono supercrítico (referente en metodología) y solo razones de menor pureza pueden ser invocadas como inconvenientes de la extracción amoniacal. La presencia de amoniaco (sugerida por FTIR) no ha sido constatada por GC-MS ni al estado de trazas, pero la de acetamida, metoxi-feniloxima y ácido n-hexadecanoico (componentes usuales, producidos en procesos de tostación) se encuentra incrementada. Tal contaminación no constituye un inconveniente para su aplicación como ingredientes en la formulación de alimentos como aditivos naturales, pero, en todo caso, puede ser minimizada por la introducción de condiciones menos drásticas que las utilizadas.
2. Los ensayos de actividad *in vitro* demuestran una alta actividad antimicrobiana de los extractos, con concentraciones mínimas inhibitorias en el rango de 15,6–375, 31,2–1000, 62,5–1000, y 62,5–1500 µg/mL frente a *F. xylarioides*, *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum*, respectivamente, dependiendo del residuo empleado. Los mejores resultados se han obtenido para la piel de plata, con MICs de 15,62, 31,25, 62,5, y 62,5 µg/mL frente a *F. xylarioides*, *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum*, respectivamente.
3. El extracto amoniacal de piel de plata ha dado lugar a la completa inhibición de la traqueomicosis del cafeto causada por *F. xylarioides* en plantas de *C. arabica* tras 30 días de inoculación a una concentración de 62,5 µg/mL.
4. La aplicación del extracto amoniacal de piel de plata de los granos de café ha resultado en una completa protección frente a *A. flavus*, *A. niger*, y *P. verrucosum* tras 28 días de incubación a una concentración de 62,5 µg/mL.

## 7. REFERENCIAS

1. Nigam, P.S.; Singh, A. Cocoa and coffee fermentations. In *Encyclopedia of food microbiology*, Batt, C.A., Tortorello, M.L., Eds. Academic Press: London, UK, 2014; 10.1016/b978-0-12-384730-0.00074-4pp. 485-492.
2. Serna-Jiménez, J.A.; Siles, J.A.; de los Ángeles Martín, M.; Chica, A.F. A review on the applications of coffee waste derived from primary processing: Strategies for revalorization. *Processes* **2022**, *10*, 2436, doi:10.3390/pr10112436.
3. Esquivel, P.; Jiménez, V.M. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* **2012**, *46*, 488-495, doi:10.1016/j.foodres.2011.05.028.
4. Bertrand, B.; Guyot, B.; Anthony, F.; Lashermes, P. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theoretical and Applied Genetics* **2003**, *107*, 387-394, doi:10.1007/s00122-003-1203-6.
5. Gielissen, R.; Graafland, J. Concepts of price fairness: empirical research into the Dutch coffee market. *Business Ethics: A European Review* **2009**, *18*, 165-178, doi:10.1111/j.1467-8608.2009.01555.x.
6. Lee, Y.G.; Cho, E.J.; Maskey, S.; Nguyen, D.T.; Bae, H.J. Value-added products from coffee waste: A review. *Molecules* **2023**, *28*, 3562, doi:10.3390/molecules28083562.
7. Gemechu, F.G. Embracing nutritional qualities, biological activities and technological properties of coffee byproducts in functional food formulation. *Trends in Food Science & Technology* **2020**, *104*, 235-261, doi:10.1016/j.tifs.2020.08.005.
8. Iriondo-DeHond, A.; Iriondo-DeHond, M.; Del Castillo, M.D. Applications of compounds from coffee processing by-products. *Biomolecules* **2020**, *10*, doi:10.3390/biom10091219.
9. Guimarães, R.J.; Borém, F.M.; Shuler, J.; Farah, A.; Peres Romero, J.C. Chapter 2: Coffee Growing and Post-harvest Processing. In *Coffee: Production, Quality and Chemistry*, Farah, A., Ed. The Royal Society of Chemistry: Croydon, UK, 2019; 10.1039/9781782622437-00026pp. 26-88.
10. Rebollo-Hernanz, M.; Aguilera, Y.; Gil-Ramírez, A.; Benítez, V.; Cañas, S.; Braojos, C.; Martín-Cabrejas, M.A. Biorefinery and stepwise strategies for valorizing coffee by-products as bioactive food ingredients and nutraceuticals. *Applied Sciences* **2023**, *13*, 8326, doi:10.3390/app13148326.
11. Cruz, R. Coffee by-products: Sustainable agro-industrial recovery and impact on vegetables quality. Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2014.
12. Blinová, L.; Sirotiak, M.; Bartošová, A.; Soldán, M. Review: Utilization of waste from coffee production. *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology* **2017**, *25*, 91-101, doi:10.1515/rput-2017-0011.
13. Kataya, G.; Issa, M.; Hijazi, A. Valorization of coffee residue waste-Mini review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* **2023**, *52*, 43772-43777, doi:10.26717/BJSTR.2023.52.008260.
14. Franca, A.S.; Oliveira, L.S. Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives. *Agricultural Wastes* **2009**, *9*, 155-189.
15. Madahava Naidu, M.; Vijayanada, P.; Usha Devi, A.; Vijayalakshmi, M.; Ramalakshmi, K. Utilization of coffee by-products in food industry, preparation of jam using coffee pulp as raw material. In Proceedings of Plantation crops research and development in the new millennium, PLACROSYM XVI, Kasaragod, India; pp. 201-203.
16. Mirón-Mérida, V.A.; Yáñez-Fernández, J.; Montañez-Barragán, B.; Barragán Huerta, B.E. Valorization of coffee parchment waste (*Coffea arabica*) as a source of caffeine and phenolic

- compounds in antifungal gellan gum films. *LWT* **2019**, *101*, 167-174, doi:10.1016/j.lwt.2018.11.013.
17. Pourfarzad, A.; Mahdavian-Mehr, H.; Sedaghat, N. Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* **2013**, *50*, 599-606, doi:10.1016/j.lwt.2012.08.001.
  18. Ballesteros, L.F.; Teixeira, J.A.; Mussatto, S.I. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology* **2014**, *7*, 3493-3503, doi:10.1007/s11947-014-1349-z.
  19. Borrelli, R.C.; Esposito, F.; Napolitano, A.; Ritieni, A.; Fogliano, V. Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 1338-1343, doi:10.1021/jf034974x.
  20. Iriondo-DeHond, A.; Haza, A.I.; Ávalos, A.; del Castillo, M.D.; Morales, P. Validation of coffee silverskin extract as a food ingredient by the analysis of cytotoxicity and genotoxicity. *Food Research International* **2017**, *100*, 791-797, doi:10.1016/j.foodres.2017.08.012.
  21. Iriondo-DeHond, A.; Aparicio García, N.; Fernandez-Gomez, B.; Guisantes-Batan, E.; Velázquez Escobar, F.; Blanch, G.P.; San Andres, M.I.; Sanchez-Fortun, S.; del Castillo, M.D. Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innov Food Sci Emerg Technol* **2019**, *51*, 194-204, doi:10.1016/j.ifset.2018.06.010.
  22. Campa, C.; Mondolot, L.; Rakotondravao, A.; Bidet, L.P.R.; Gargadennec, A.; Couturon, E.; La Fisca, P.; Rakotomalala, J.-J.; Jay-Allemand, C.; Davis, A.P. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. *Annals of Botany* **2012**, *110*, 595-613, doi:10.1093/aob/mcs119.
  23. del Castillo, M.D.; Fernández-Gómez, B.; Martínez-Sáez, N.; Iriondo-DeHond, A.; Mesa, M.D. Chapter 12: Coffee By-products. In *Coffee: Production, Quality and Chemistry*, Farah, A., Ed. The Royal Society of Chemistry: Croydon, UK, 2019; 10.1039/9781782622437-00309pp. 309-334.
  24. Rutherford, M.A. Current knowledge of coffee wilt disease, a major constraint to coffee production in Africa. *Phytopathology* **2006**, *96*, 663-666, doi:10.1094/phyto-96-0663.
  25. Mulatu, A. Incidence and prevalence of coffee wilt disease *Gibberella xylarioides* and its impact on the rural livelihoods in Western Guji Zone, Southern Ethiopia. *American Journal of BioScience* **2019**, *7*, 7, doi:10.11648/j.ajbio.20190701.12.
  26. Mulatu, A.; Megersa, N.; Teferi, D.; Alemu, T.; Vetukuri, R.R. Biological management of coffee wilt disease (*Fusarium xylarioides*) using antagonistic *Trichoderma* isolates. *Front Plant Sci* **2023**, *14*, 1113949, doi:10.3389/fpls.2023.1113949.
  27. Zhang, X.; Peck, L.D.; Flood, J.; Ryan, M.J.; Barraclough, T.G. Temperature contributes to host specialization of coffee wilt disease (*Fusarium xylarioides*) on arabica and robusta coffee crops. *Sci Rep* **2023**, *13*, 9327, doi:10.1038/s41598-023-36474-w.
  28. Lu, L.; Tibpromma, S.; Karunarathna, S.C.; Jayawardena, R.S.; Lumyong, S.; Xu, J.; Hyde, K.D. Comprehensive Review of Fungi on Coffee. *Pathogens* **2022**, *11*, 411, doi:10.3390/pathogens11040411.
  29. Illy, A.; Viani, R. *Espresso coffee: The science of quality*, 2nd ed.; Elsevier Academic: Amsterdam; Boston, 2005; pp. 398.
  30. Batista, L. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *85*, 293-300, doi:10.1016/s0168-1605(02)00539-1.
  31. Silva, C.F.; Batista, L.R.; Schwan, R.F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology* **2008**, *39*, 521-526, doi:10.1590/s1517-83822008000300022.

32. Taniwaki, M.H.; Pitt, J.I.; Hocking, A.D.; Fleet, G.H. Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. In *Advances in Food Mycology*, Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U., Eds. Springer: Boston, MA, 2006; Vol. 571, pp. 49-67.
33. García-Moraleja, A.; Font, G.; Mañes, J.; Ferrer, E. Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *86*, 225-233, doi:10.1016/j.fct.2015.10.014.
34. Commission, E. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union* **2006**, *364*, 365-324.
35. Suárez-Quiroz, M.; González-Rios, O.; Barel, M.; Guyot, B.; Schorr-Galindo, S.; Guiraud, J.P. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2004**, *39*, 501-507, doi:10.1111/j.1365-2621.2004.00810.x.
36. Bokhari, F.; Aly, M. Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. *Adv. Biol. Res* **2009**, *3*, 71-78.
37. Paterson, R.R.M.; Lima, N.; Taniwaki, M.H. Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International* **2014**, *61*, 1-15, doi:10.1016/j.foodres.2014.03.037.
38. Cabañes, F.J.; Bragulat, M.R.; Castellá, G. Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins* **2010**, *2*, 1111-1120, doi:10.3390/toxins2051111.
39. Castillo, N.E.T.; Acosta, Y.A.; Parra-Arroyo, L.; Martínez-Prado, M.A.; Rivas-Galindo, V.M.; Iqbal, H.M.N.; Bonaccorso, A.D.; Melchor-Martinez, E.M.; Parra-Saldivar, R. Towards an eco-friendly coffee rust control: Compilation of natural alternatives from a nutritional and antifungal perspective. *Plants* **2022**, *11*, 2745, doi:10.3390/plants11202745.
40. Monente, C.; Bravo, J.; Vitas, A.I.; Arbillaga, L.; De Peña, M.P.; Cid, C. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *Journal of Functional Foods* **2015**, *12*, 365-374, doi:10.1016/j.jff.2014.12.006.
41. Chaves-Ulate, C.; Rodríguez-Sánchez, C.; Arias-Echandi, M.L.; Esquivel, P. Antimicrobial activities of phenolic extracts of coffee mucilage. *NFS Journal* **2023**, *31*, 50-56, doi:10.1016/j.nfs.2023.03.005.
42. Alström, S. Antibacterial activity of tea and coffee wastes against some plant pathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Journal of Phytopathology* **2008**, *136*, 329-334, doi:10.1111/j.1439-0434.1992.tb01315.x.
43. Díaz-Hernández, G.C.; Alvarez-Fitz, P.; Maldonado-Astudillo, Y.I.; Jiménez-Hernández, J.; Parra-Rojas, I.; Flores-Alfaro, E.; Salazar, R.; Ramírez, M. Antibacterial, antiradical and antiproliferative potential of green, roasted, and spent coffee extracts. *Applied Sciences* **2022**, *12*, 1938, doi:10.3390/app12041938.
44. Farouk, A.; Alsulami, T.; Ali, H.S.; Badr, A.N. *In-vitro* and *in-silico* investigation for the spent-coffee bioactive phenolics as a promising aflatoxins production inhibitor. *Toxins* **2023**, *15*, 225, doi:10.3390/toxins15030225.
45. Calheiros, D.; Dias, M.I.; Calhelha, R.C.; Barros, L.; Ferreira, I.; Fernandes, C.; Goncalves, T. Antifungal activity of spent coffee ground extracts. *Microorganisms* **2023**, *11*, 242, doi:10.3390/microorganisms11020242.
46. Sangta, J.; Wongkaew, M.; Tangpao, T.; Withee, P.; Haituk, S.; Arjin, C.; Sringarm, K.; Hongsihsong, S.; Sutan, K.; Pusadee, T.; Sommano, S.R.; Cheewangkoon, R. Recovery of polyphenolic fraction from Arabica coffee pulp and its antifungal applications. *Plants* **2021**, *10*, 1422, doi:10.3390/plants10071422.

47. Rodrigues, F.; Palmeira-de-Oliveira, A.; das Neves, J.; Sarmiento, B.; Amaral, M.H.; Oliveira, M.B.P.P. Coffee silverskin: A possible valuable cosmetic ingredient. *Pharm. Biol.* **2014**, *53*, 386-394, doi:10.3109/13880209.2014.922589.
48. Ziemah, J.; Ullrich, M.S.; Kuhnert, N. Antibacterial activity potential of industrial food production waste extracts against pathogenic bacteria: Comparative analysis and characterization. *Foods* **2024**, *13*, 1902, doi:10.3390/foods13121902.
49. Nzekoue, F.K.; Angeloni, S.; Navarini, L.; Angeloni, C.; Freschi, M.; Hrelia, S.; Vitali, L.A.; Sagratini, G.; Vittori, S.; Caprioli, G. Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Research International* **2020**, *133*, 109128, doi:10.1016/j.foodres.2020.109128.
50. Duangjai, A.; Suphrom, N.; Wungrath, J.; Ontawong, A.; Nuengchamnon, N.; Yosboonruang, A. Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integrative Medicine Research* **2016**, *5*, 324-331, doi:10.1016/j.imr.2016.09.001.
51. Sánchez-Hernández, E.; Martín-Ramos, P.; Martín-Gil, J.; Santiago-Aliste, A.; Hernández-Navarro, S.; Oliveira, R.; González-García, V. Bark extract of *Uncaria tomentosa* L. for the control of strawberry phytopathogens. *Horticulturae* **2022**, *8*, 672, doi:10.3390/horticulturae8080672.
52. Arendrup, M.C.; Cuenca-Estrella, M.; Lass-Flörl, C.; Hope, W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, E246–E247, doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x.
53. Sánchez-Hernández, E.; González-García, V.; Palacio-Bielsa, A.; Casanova-Gascón, J.; Navas-Gracia, L.M.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. Phytochemical constituents and antimicrobial activity of *Euphorbia serrata* L. extracts for *Borago officinalis* L. crop protection. *Horticulturae* **2023**, *9*, 652, doi:10.3390/horticulturae9060652.
54. González, V.; Ruiz, J.; Picó, B.; García-Martínez, S.; Garcés-Claver, A.; Flores-León, A. First report of *Neocosmospora falciformis* causing wilt and root rot of muskmelon in Spain. *Plant Disease* **2020**, *104*, 4, doi:10.1094/PDIS-09-19-2013-PDN.
55. Sánchez-Hernández, E.; González-García, V.; Correa-Guimarães, A.; Casanova-Gascón, J.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. Phytochemical profile and activity against *Fusarium* species of *Tamarix gallica* bark aqueous ammonia extract. *Agronomy* **2023**, *13*, 496, doi:10.3390/agronomy13020496.
56. Clifford, M.N.; Kirkpatrick, J.; Kuhnert, N.; Roozendaal, H.; Salgado, P.R. LC–MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. *Food Chem.* **2008**, *106*, 379-385, doi:10.1016/j.foodchem.2007.05.081.
57. Machado, M.; Espírito Santo, L.; Machado, S.; Lobo, J.C.; Costa, A.S.G.; Oliveira, M.B.P.P.; Ferreira, H.; Alves, R.C. Bioactive potential and chemical composition of coffee by-products: From pulp to silverskin. *Foods* **2023**, *12*, 2354, doi:10.3390/foods12122354.
58. Sánchez-Hernández, E.; Andrés-Juan, C.; Buzón-Durán, L.; Correa-Guimaraes, A.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. Antifungal activity of methylxanthines against grapevine trunk diseases. *Agronomy* **2022**, *12*, 885.
59. Ganesan, T.; Subban, M.; Christopher Leslee, D.B.; Kuppanan, S.B.; Seedeve, P. Structural characterization of n-hexadecanoic acid from the leaves of *Ipomoea eriocarpa* and its antioxidant and antibacterial activities. *Biomass Conversion and Biorefinery* **2024**, *14*, 14547-14558, doi:10.1007/s13399-022-03576-w.

60. Patel, J.K.; Mistry, Y.; Soni, R.; Jha, A. Evaluation of antifungal activity of endophytic *Bacillus* spp. and identification of secondary metabolites produced against the phytopathogenic fungi. *Current Microbiology* **2024**, *81*, 128, doi:10.1007/s00284-024-03652-6.
61. Heena; Kaushal, S.; Kaur, V.; Panwar, H.; Sharma, P.; Jangra, R. Isolation of quinic acid from dropped *Citrus reticulata* Blanco fruits: its derivatization, antibacterial potential, docking studies, and ADMET profiling. *Frontiers in Chemistry* **2024**, *12*, 1372560.
62. Muthamil, S.; Balasubramaniam, B.; Balamurugan, K.; Pandian, S.K. Synergistic effect of quinic acid derived from *Syzygium cumini* and undecanoic acid against *Candida* spp. biofilm and virulence. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 2835, doi:10.3389/fmicb.2018.02835.
63. Guimarães, A.; Venâncio, A. The potential of fatty acids and their derivatives as antifungal agents: A review. *Toxins* **2022**, *14*, 188, doi:10.3390/toxins14030188.
64. Kocaçalışkan, I.; Talan, I.; Terzi, I. Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as allelochemicals. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2006**, *61*, 639-642, doi:10.1515/znc-2006-9-1004.
65. Pereira, C.B.; Pereira de Sá, N.; Borelli, B.M.; Rosa, C.A.; Barbeira, P.J.S.; Cota, B.B.; Johann, S. Antifungal activity of eicosanoic acids isolated from the endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *Microbial Pathogenesis* **2016**, *100*, 205-212, doi:10.1016/j.micpath.2016.09.022.
66. Kiprono, P.C.; Kaberia, F.; Keriko, J.M.; Karanja, J.N. The in vitro anti-fungal and anti-bacterial activities of beta-sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). *Z Naturforsch C J Biosci* **2000**, *55*, 485-488, doi:10.1515/znc-2000-5-629.
67. Li, Q.; Zhu, X. Vanillin and its derivatives, potential promising antifungal agents, inhibit *Aspergillus flavus* spores via destroying the integrity of cell membrane rather than cell wall. *Grain & Oil Science and Technology* **2021**, *4*, 54-61, doi:10.1016/j.gaost.2021.03.002.
68. Tsirilakis, K.; Kim, C.; Vicencio, A.G.; Andrade, C.; Casadevall, A.; Goldman, D.L. Methylxanthine inhibit fungal chitinases and exhibit antifungal activity. *Mycopathologia* **2012**, *173*, 83-91, doi:10.1007/s11046-011-9483-x.
69. Pánek, M.; Borůvka, V.; Nábělková, J.; Šimůnková, K.; Zeidler, A.; Novák, D.; Černý, R.; Kobetičová, K. Efficacy of caffeine treatment for wood protection—influence of wood and fungi species. *Polymers* **2021**, *13*, 3758, doi:10.3390/polym13213758.
70. Kobetičová, K.; Nábělková, J.; Ďurišová, K.; Šimůnková, K.; Černý, R. Antifungal activity of methylxanthines based on their properties. *BioResources* **2020**, *15*, 8110-8120, doi:10.15376/biores.15.4.8110-8120.
71. Šimůnková, K.; Reinprecht, L.; Nábělková, J.; Hýsek, Š.; Kindl, J.; Borůvka, V.; Lišková, T.; Šobotník, J.; Pánek, M. Caffeine – Perspective natural biocide for wood protection against decaying fungi and termites. *Journal of Cleaner Production* **2021**, *304*, 127110, doi:10.1016/j.jclepro.2021.127110.
72. Sugiyama, A.; Sano, C.M.; Yazaki, K.; Sano, H. Caffeine fostering of mycoparasitic fungi against phytopathogens. *Plant Signaling & Behavior* **2016**, *11*, doi:10.1080/15592324.2015.1113362.
73. Reinke, A.; Chen, J.C.Y.; Aronova, S.; Powers, T. Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 31616-31626, doi:10.1016/s0021-9258(19)84075-9.
74. Wang, Y.-C.; Qian, W.-J.; Li, N.-N.; Hao, X.-Y.; Wang, L.; Xiao, B.; Wang, X.-C.; Yang, Y.-J. Metabolic changes of caffeine in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) as defense response to *Colletotrichum fructicola*. *J. Agric. Food. Chem.* **2016**, *64*, 6685-6693, doi:10.1021/acs.jafc.6b02044.

75. Nasrollahi, Z.; Yadegari, M.H. Antifungal activity of caffeine in combination with fluconazole against *Candida albicans*. *Infection, Epidemiology and Medicine* **2016**, *2*, 18-21, doi:10.18869/modares.iem.2.2.18.
76. Jiménez-Zamora, A.; Pastoriza, S.; Rufián-Henares, J.A. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology* **2015**, *61*, 12-18, doi:10.1016/j.lwt.2014.11.031.