



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

Determinación del Potencial antimicrobiano de extractos derivados de la cáscara y el mucílago del café por tres métodos

María Camila Pérez Arias

Manuela Tuberquia Garcés

Trabajo de grado presentado para optar al título de Microbiólogo Industrial y Ambiental

Asesora

Luisa Fernanda Rojas Hoyos, Doctor (PhD) en Biología

Universidad de Antioquia
Grupo de Biotransformación
Escuela de Microbiología
Microbiología Industrial y Ambiental
Medellín, Antioquia, Colombia

2023

Assessment of Antimicrobial Potential of Extracts Derived from Coffee Husk and Mucilage Using Three Methods

Abstract

This study evaluated the antibacterial potential of coffee husk and mucilage against indicator microorganisms for the quality of meat products and others. Previously characterized extracts were used, considering their content of chlorogenic acids and antioxidant capacity. Three methods were employed to determine the antibacterial capacity: disk diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), and median inhibitory concentration (IC₅₀). The enriched 97:3 extract (L5) demonstrated high efficacy against *S. aureus*, achieving nearly 90% inhibition at 1.5 mg/mL and an IC₅₀ of 0.087 mg/mL. However, the coffee husk extract (M) was not effective at concentrations below 2%, with inhibition percentages below 30%. Overall, a positive correlation was observed between the evaluated methodologies, although discrepancies may arise due to the substance's diffusion capacity and the actual concentration in the culture medium.

Keywords: potential antibacterial, coffee husk, coffee mucilage, disk diffusion, minimum inhibitory concentration, median inhibitory concentration, indicator microorganisms for the quality.

Determinación del Potencial antimicrobiano de extractos derivados de la cáscara y el mucílago del café por tres métodos

Resumen

Este estudio evaluó el potencial antibacteriano de la cáscara y el mucílago de café, en microorganismos indicadores de la calidad de productos cárnicos y otros. Se utilizaron extractos previamente caracterizados en cuanto a su contenido de ácidos clorogénicos y capacidad antioxidante. Se emplearon tres métodos para determinar la capacidad antibacteriana: difusión en disco, concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración media inhibitoria (IC₅₀). El extracto CMC enriquecido 97:3 (L5) mostró una alta eficacia contra *S. aureus*, con una inhibición de casi el 90% a 1,5 mg/mL y un IC₅₀ de 0,087 mg/mL. Sin embargo, el extracto de cáscara de café (M) no fue efectivo a concentraciones inferiores al 2%, con porcentajes de inhibición por debajo del 30%. En general, se observó una correlación positiva entre las metodologías evaluadas, aunque las discrepancias pueden deberse a la capacidad de difusión y la concentración en el medio de cultivo.

Palabras clave: potencial antibacteriano, cáscara de café, mucílago de café, inhibición, difusión en disco, concentración mínima inhibitoria, concentración media inhibitoria, microorganismos indicadores de calidad.

1. Introducción

El café es uno de los principales productos industriales de Colombia, que destina más del 80% de la producción para el comercio internacional. En el 2019 la producción de café fue de 14,8 millones de sacos de 60 kilos, un 9% más que el 2018, volumen de producción que no se registraba desde hace más de 25 años (1). En los países productores de café, la disposición inadecuada de los desechos tiene un impacto negativo en el ambiente debido a su alta concentración en cafeína, polifenoles, taninos y alta acidez. La preocupación por el medio ambiente es cada vez mayor y se alienta a las industrias a formular productos ecológicos y naturales para buscar economía circular, de tal forma que puedan ser usados y convertidos en recursos de valor agregado. Sin embargo, más del 50% de los frutos del café

se descartan cuando podrían tener un uso potencial en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética. Por lo tanto, la extracción de bioactivos como los polifenoles del café es de gran valor (2).

Según la FAO, entre los alimentos que se producen en todo el mundo se pierden entre el 30-50%, debido al deterioro microbiano. Además, la carga mundial estimada de enfermedades transmitidas por alimentos es de unos 600 millones de personas, donde 420.000 llevan a la muerte (3). Las infecciones diarreicas son las más comúnmente asociadas al consumo de alimentos contaminados, afectan cada año a unos 550 millones de personas y provocan 230.000 muertes (4).

Hoy en día, el número de empresas que se dedican a la fabricación y procesamiento de alimentos ha incrementado notablemente. Por lo cual, la contaminación de los alimentos por microorganismos y la oxidación desenfrenada por especies reductoras de oxígeno son los principales causantes del deterioro de los alimentos procesados, durante el procesamiento, transporte y almacenamiento, por tanto, la conservación de los alimentos es fundamental (5).

Algunos de los conservantes naturales más utilizados son el ácido ascórbico (vitamina C) y los tocoferoles (vitamina E), que actúan como antioxidantes (6). El extracto de romero, el ácido cítrico y el ácido láctico también se utilizan como conservantes naturales. Otros conservantes naturales incluyen la nisina, un péptido antimicrobiano, y el extracto de té verde, rico en catequinas con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Estos conservantes naturales se consideran seguros y ofrecen una alternativa a los conservantes sintéticos en la industria alimentaria (7).

Los compuestos fenólicos son un grupo importante de metabolitos secundarios vegetales que presentan actividades antioxidantes, antiproliferativas, antialérgicas, anticancerígenas, antimicrobianas, antitumorales, antiinflamatorias y neuroprotectoras (8). El ácido protocatecuico como el ácido clorogénico son ácidos fenólicos, que se encuentran en los residuos del café y estos han mostrado una inhibición eficaz para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y especialmente *L. monocytogenes* con el ácido protocatecuico. La capacidad inhibidora del ácido clorogénico es eficaz contra bacterias gramnegativas, incluidas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella dysenteriae* y bacterias grampositivas, como *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (9).

La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos aislados de fuentes naturales está asociada con proteínas específicas de membrana (9). La interacción con la membrana externa de los microorganismos provoca varios cambios en la permeabilidad celular, la cual es dependiente de la célula bacteriana y composición de la pared (10).

En cuanto a las pruebas antimicrobianas, la literatura describe la concentración mínima inhibitoria (MIC) realizada por micro dilución en placas de pozos y la difusión en disco como las técnicas más empleadas, debido a la excelente correlación entre las MIC y los valores de difusión en disco (11). La difusión en placa es un método fenotípico para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que combina simplicidad y rentabilidad. Otra ventaja es que la visualización del crecimiento permite detectar la adecuación del inóculo, los cultivos mixtos, la heterorresistencia y las interacciones entre antibióticos. La desventaja de esta metodología es que no está completamente automatizada y la interpretación de los diámetros de la zona de inhibición está sujeta a variaciones entre observadores, además no cuenta con estandarizado contra algunos microorganismos fastidiosos y/o de crecimiento lento (11). La concentración mínima inhibitoria (MIC) se define como la concentración mínima en ($\mu\text{g/ml}$) de un agente antimicrobiano que evita el crecimiento visible del microorganismo después de 24 horas de incubación a 37 °C (12). El IC_{50} es la concentración de fármaco requerida para una inhibición del 50% (13).

Se ha demostrado que el café tiene actividad antimicrobiana contra una variedad de microorganismos, incluidos los patógenos transmitidos por los alimentos. Varias investigaciones resaltan el potencial de los residuos de la industria del café en búsqueda de nuevas aplicaciones. Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue evaluar el potencial antibacteriano de subproductos del café contra algunos microorganismos indicadores de la calidad de productos cárnicos y lácteos, entre otros, a partir de tres métodos: i) antagonismo por difusión en disco, ii) determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) y iii) determinación de la concentración media inhibitoria (IC_{50}).

2. Metodología

2.1 Material biológico

2.1.1 Muestras de análisis

Para este estudio, se emplearon extractos de cascara de café y concentrado de mucílago de café, además de mezclas que consistían en concentrado de mucílago de café enriquecido con cascara de café en diferentes proporciones, obtenidas de un centro de procesamiento de café de Salgar, Antioquia (5.94817 - 7595056). En la tabla 1 se describen las mezclas empleadas.

Tabla 1.
Descripción de muestras de ensayo

Código interno	Descripción	Código fabricante
M	Extracto cáscara de café rotaevaporador	A3720M
L1	Concentrado de mucílago de café (CMC)	A3720L1
L2	Mucílago de café enriquecido 80:20	A3720L2
L3	Mucílago de café enriquecido 90:10	A3720L3
L4	Mucilago café enriquecido 95:5	A3720L4
L5	Mucilago café enriquecido 97:3	A3720L5

2.1.2 Microorganismos.

Los microorganismos seleccionados para la evaluación antimicrobiana de los extractos de café fueron determinados acorde a la NTC 1325 donde se indican los microorganismos obligatorios que se deben evaluar para garantizar la calidad microbiológica en productos cárnicos y la resolución 1407 de 2022 en la cual se establecen los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas destinados para consumo humano. Las cepas evaluadas fueron: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9017, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 14579. Estos microorganismos fueron obtenidos de la colección biológica de la Escuela de Microbiología.

2.2 Metodología para la determinación del contenido de polifenoles totales (CPT)

Con el fin de correlacionar los datos suministrados por el fabricante de los extractos, se analizó el CPT por em método de Folin-Ciocalteu, acorde al método reportado por Rojas et al (2021), empleando como estándar una curva de ácido gálico, expresada en μg equivalentes de ácido gálico por mililitro ($\mu\text{g GAE/mL}$). El rango de la curva de calibración se realizó entre 10-200 $\mu\text{g GAE/mL}$. La mezcla de reacción estuvo conformada por 100 μL de muestra, 100 μL de Na_2CO_3 al 20% y 50 μL del reactivo de Folin (14), ajustados hasta un volumen de 1 mL con agua destilada. Se incubaron las muestras durante 1 h en completa oscuridad y temperatura ambiente y la absorbancia fue leída en espectrofotómetro (SPECTRONIC GENESYS 2PC) a 760 nm.

2.3 Determinación de la actividad antibacteriana

Para el desarrollo del trabajo se evaluaron tres métodos diferentes para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos.

2.3.1 Prueba de antagonismo

Para la determinación de la actividad antibacteriana de los diferentes extractos de mucílago y cáscara de café contra todas las cepas evaluadas, se llevó a cabo el ensayo de difusión en disco en agar, para ello se prepararon tres concentraciones diferentes de cada extracto (20, 50, 100 mg/mL) utilizando agua destilada estéril como diluyente. Las cepas se cultivaron en caldo triptona de soya (TSB, acumedia) a 36°C , 120 rpm durante 18 h. Las suspensiones preparadas se ajustaron al patrón McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Se sembraron masivamente las suspensiones bacterianas en Agar triptona de soya (TSA, MERK) utilizando un hisopo estéril. Se colocaron discos estériles de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con 15 μL de los extractos, así mismo un control positivo (15 μL gentamicina 1,5 %) y negativo (15 μL solución salina 0.9%). Los cultivos se incubaron a 36°C durante 24 horas, después se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de cada disco y se registró en milímetros. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.3.2 Metodología para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Se evaluó la MIC de extractos de cáscara y mucílago de café sobre microorganismos patógenos mediante el método de micro dilución en placas ELISA de 98 pozos. Según (15) adaptado.

Se cultivaron las cepas bacterianas en caldo triptona de soya (TSB, Acumedia) a 36°C, 120 rpm durante 18 h. Las suspensiones preparadas se ajustaron al patrón McFarland 0,5 (15 x10⁸ CFU/mL), con el fin de disminuir la carga bacteriana a 1,5x10⁵ UFC se realizó una dilución con caldo triptona de soya (TSB, acumedia) como diluyente. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas de cada extracto (desde 1,5 hasta 0,011 mg/mL) en TSB. En cada pozo se agregó 100 µL de extracto con 100 µL del inóculo. Se incluyeron pozos de control positivo (100 µL Inóculo y 100 µL TSB). Se evaluó el antibiótico comercial gentamicina a las mismas concentraciones (desde 1,5 hasta 0,011 mg/mL) con el fin de comparar la actividad antimicrobiana. Las placas se incubaron a 36°C por 24 horas, se agitaron y se midió la absorbancia a 600 nm utilizando un lector de placas (Multiskan GO 1510-03778). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.3.3 Metodología para la determinación de la IC₅₀

La IC₅₀ fue determinada a partir del cálculo del porcentaje de inhibición para las diferentes concentraciones de extracto evaluadas entre 1,5 mg/mL y 0,01 mg/mL, obtenidas por dilución seriada con la ec. (1) y posteriormente mediante ajuste modelo logarítmico de inhibición dosis respuesta planteado en la ec. (2). El análisis de los datos fue realizado mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 5.0.

$$\%I = \frac{A_{ctrl+} - A_{ext}}{A_{ctrl+}} \times 100 \quad (1)$$

Donde %I es el porcentaje de inhibición para cada concentración (%), A_{ctrl+} es la absorbancia del control positivo para cada microorganismo evaluado y A_{ext} es absorbancia obtenida para cada microorganismo en presencia de las diferentes concentraciones de extracto crudo.

$$\%I = \frac{\%I_0 + \%I_f}{1 + 10^{(\log C - \log IC_{50})}} \quad (2)$$

Donde %I₀ es el porcentaje de inhibición inicial (%), %I_f es el porcentaje de inhibición final (%), C es la concentración de extracto crudo (mg/mL) y IC₅₀ es la concentración de extracto crudo con la cual es alcanzado el 50% de la inhibición (mg/mL).

3. Resultados

3.1 Descripción y determinación del contenido de polifenoles totales de las muestras de ensayo

Al inicio del trabajo, se recibieron muestras previamente caracterizadas por el fabricante, acorde a la Tabla 2. Adicionalmente fueron realizados ensayos para la cuantificación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados de la ANOVA indicaron diferencias significativas entre los diferentes extractos de cáscara y mucílago de café, a un nivel de confianza del 95 %, para el ensayo de contenido de polifenoles totales. Anexo 1.

La información proporcionada en la tabla 2. nos muestra que el mayor contenido de ácido clorogénico se encuentra en el extracto de cáscara de café (M) con 135,035±1,230 mg/100 g de M// seguido por el extracto CMC enriquecido 80:20 (L2), CMC enriquecido 90:10 (L3), CMC enriquecido 95:5 (L4) y CMC enriquecido 97:3 (L5), siendo el de menor contenido el CMC (L1) con 2,600±0,333 mg/100 g de M//. Por lo tanto, a mayor contenido de extracto de cáscara de café mayor será el contenido de ácido clorogénico. Por el contrario, el porcentaje de sólidos es mayor a medida que se tiene mayor contenido de mucílago concentrado, siendo este el que presenta el porcentaje mayor de sólidos (76,1%) y el de menor contenido es el extracto de cáscara de café (10,7%).

La actividad antioxidante se determinó con el valor ORAC, donde podemos observar que el extracto L3 contiene la mayor actividad antioxidante (18.230,01±434,91 µmol Trolox/100 g de M//), seguido del extracto L1, L5, L4 y L2. Respecto al CPT, L3 presentó el mayor contenido (29,711±0,851 mg GAE/mL) y M mostró el menor contenido (5,637±0,045 mg GAE/mL). Se observa que a mayor contenido de polifenoles totales es mayor la actividad antioxidante. Aunque el extracto L2 tiene un contenido de polifenoles más alto que L1, L4 y L5 (25,262±2,100 mg GAE/mL), muestra el valor más bajo de actividad antioxidante (12.428,03 ± 382,4

$\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g de M//}$). Por otro lado, el extracto L1 tiene un contenido de polifenoles ($21,776 \pm 0,320 \text{ mg GAE/mL de M//}$) más bajo que L5 ($24,100 \pm 0,152$), pero muestra una actividad antioxidante mayor ($15.814,87 \pm 398,82 \mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g de M//}$).

Tabla 2.

Descripción de las muestras y contenido de polifenoles totales.

Código interno	Descripción de la muestra	ácido clorogénico (mg/100 g de M//)	Valor ORAC-Hidrofilico ($\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g de M//}$)	% de sólidos	CPT (mg GAE/mL de M//)
M	Extracto cáscara de café rotaevaporador	$135,035 \pm 1,230$	---	10,74	$5,637 \pm 0,045$
L1	Concentrado de mucílago de café (CMC)	$2,600 \pm 0,333$	$15.814,87 \pm 398,82$	76,1	$21,776 \pm 0,320$
L2	CMC enriquecido 80:20	$4.914 \pm 0,333$	$12.428,03 \pm 382,47$	63,0	$25,262 \pm 2,100$
L3	CMC enriquecido 90:10	$4.270 \pm 0,333$	$18.230,01 \pm 434,91$	69,6	$29,711 \pm 0,851$
L4	CMC enriquecido 95:5	$3.373 \pm 0,333$	$15.132,86 \pm 247,29$	72,8	$21,345 \pm 0,434$
L5	CMC enriquecido 97:3	$2,999 \pm 0,296$	$15.579,47 \pm 0,333$	74,1	$24,100 \pm 0,152$

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar ($n = 3$). GAE: equivalentes de ácido gálico. CPT: contenido de polifenoles totales

En la Fig. 1, se muestra el análisis de correlación entre el contenido de polifenoles totales y el contenido de ácidos clorogénicos, donde se observa una correlación inversa entre ambos factores. Mostrando que el ácido clorogénico disminuye a medida que aumentan los polifenoles totales, existe una correlación negativa entre los datos con un coeficiente de correlación de Pearson de $-0,9148$.

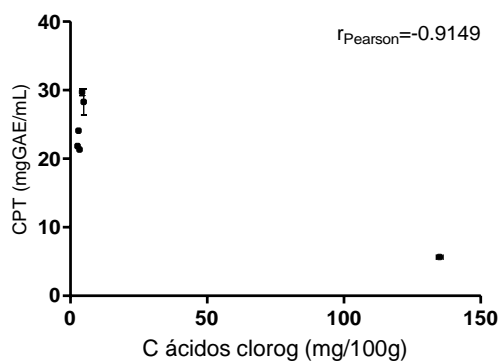


Figura 1. Análisis de correlación entre el contenido de polifenoles totales y el contenido de ácidos clorogénicos

3.2 Ensayo de antagonismo

Al evaluar los extractos de café frente a los seis microorganismos analizados, se observaron diferencias significativas en su actividad antimicrobiana mediante los ensayos de difusión en disco. Se encontró que los extractos mostraron un halo de inhibición entre 2 mm y 13 mm. La figura 2 muestra un ejemplo de la actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* ATCC 13932 y *S. aureus* ATCC 6538.

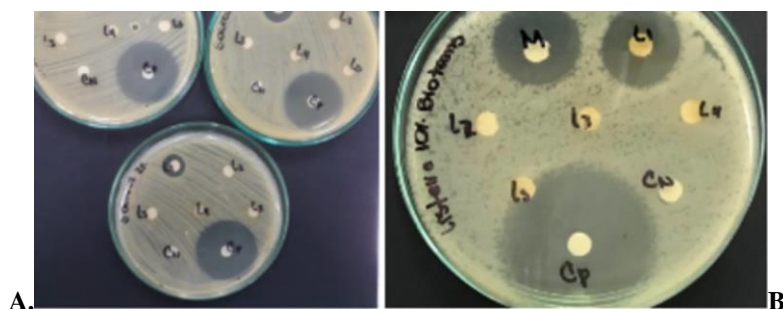


Figura 2. Resultados para la metodología de difusión en disco. actividad antimicrobiana frente *A. S. aureus* ATCC 6538 y *B. L. monocytogenes* ATCC 13932

Se empleó como control positivo gentamicina, lo que permitió establecer correlaciones para los resultados obtenidos y de esta forma se hallaron los porcentajes de inhibición, los cuales se presentan en las figuras 3 y 4.

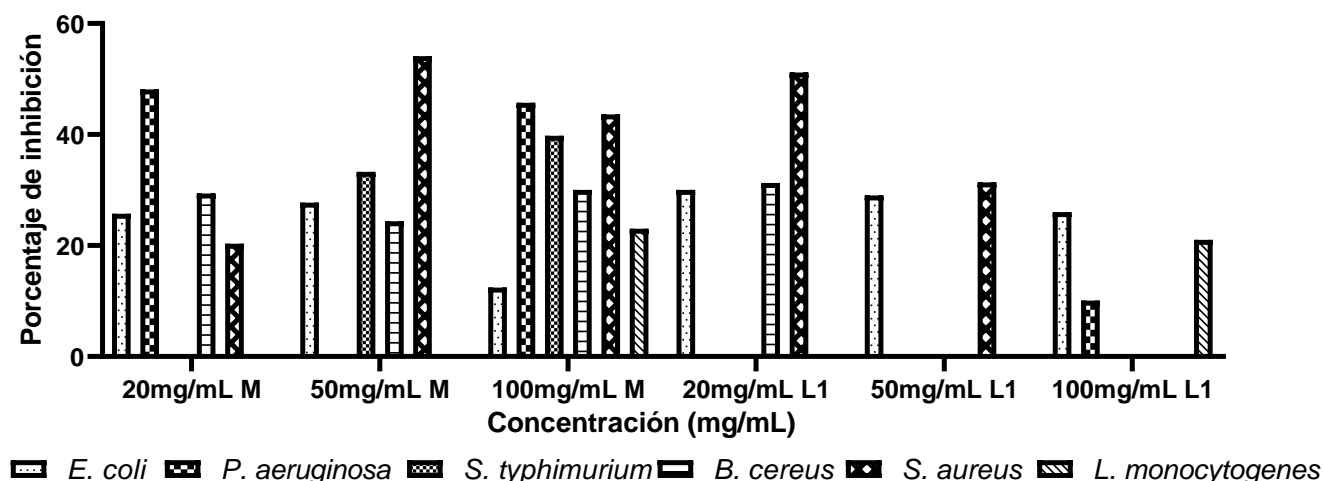


Figura 3. Resultados de porcentaje de inhibición en difusión en disco del extracto de cáscara de café (M) y elCMC (L1) frente a cada uno de los microorganismos evaluados.

En las figuras 3 y 4 podemos observar, que *E. coli* mostró tener inhibición por la mayoría de los extractos, siendo el CMC (L1) a 20 mg/mL el porcentaje más alto (30%). Por otro lado, *P. aeruginosa* presentó una inhibición de 48,1% con el extracto de cáscara de café (M) a 20 mg/mL de concentración, siendo este el mayor valor en comparación con el porcentaje de inhibición de los otros microorganismos Gram negativos. Sin embargo, para *S. typhimurium* se alcanzó un 39,8% de inhibición con el mismo extracto, pero con una concentración de 100 mg/mL. A pesar de que *E. coli* presentó sensibilidad a la mayoría de los extractos, no pudo alcanzar una tasa de inhibición tan alta como los presentados por *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*. Respecto a los microorganismos gram positivos, se observa que solo se presentó inhibición por el extracto M y L1, siendo *S. aureus* el que mostró mayor sensibilidad, obteniendo un 54,1% con M a 50 mg/mL y un 51,2% con L1 a 20 mg/mL. Seguido de *B. cereus* con un 29,4% M a 20 mg/mL y 31,3% con L1 a 20 mg/mL y solo se obtuvo inhibición de *L. monocytogenes* con M a 100 mg/mL.

Todas las cepas analizadas demostraron ser susceptibles al extracto de cáscara de café (M) a 100 mg/mL. Con relación a CMC (L1), las concentraciones de 20 mg/mL mostraron el mayor porcentaje de inhibición en comparación con las concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL. Mientras que los extractos enriquecidos, CMC enriquecido 80:20 (L2), mostró actividad antimicrobiana contra dos microorganismos, *E. coli* presentó susceptibilidad a todas las concentraciones de L2 evaluadas y *B. cereus* solo fue susceptible a una concentración de 20 mg/mL. Para extractos que presentan mayor proporción de mucílago: CMC enriquecido 90:10 (L3), CMC enriquecido 95:5 (L4) y CMC enriquecido 97:3 (L5), no se presenta inhibición en la mayoría de los microorganismos por este método de difusión en disco.

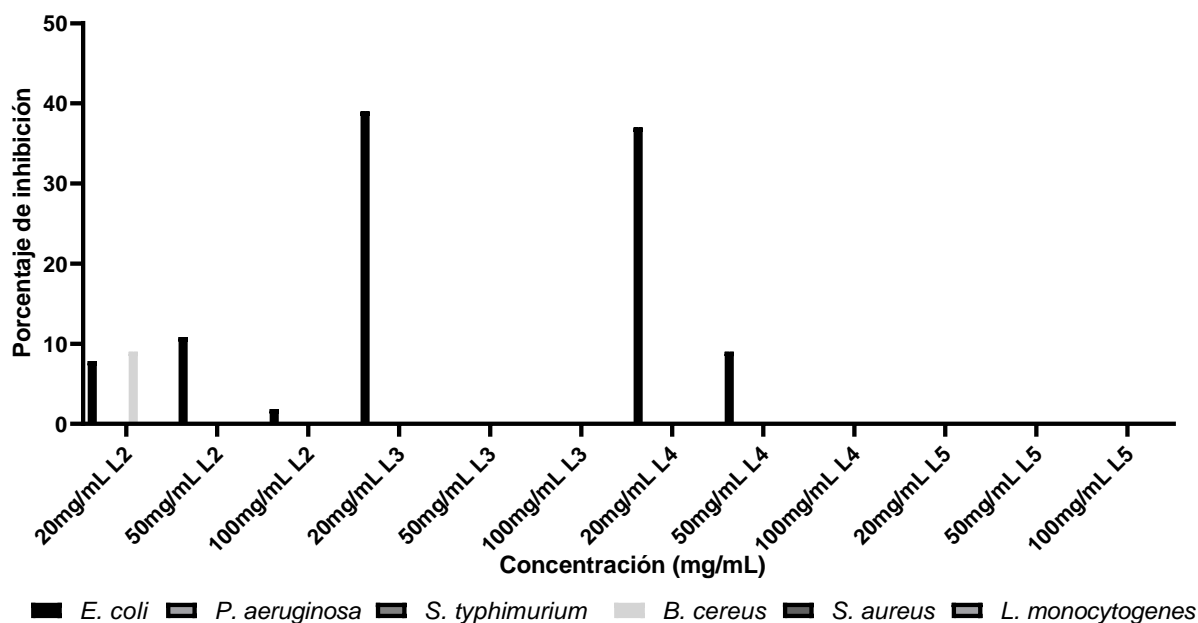


Figura 4. Resultados de porcentaje de inhibición en difusión en disco de los extractos: CMC enriquecido 80:20 (L2), CMC enriquecido 90:10 (L3), CMC enriquecido 95:5 (L4), CMC enriquecido 97:3 (L5) frente a cada uno de los microorganismos evaluados.

3.3 Concentración Mínima Inhibitoria

Con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizaron ensayos por la técnica de micro dilución. Los resultados mostraron que no hay actividad bactericida contra los microorganismos evaluados. Tabla 3

Tabla 3.

Actividad antibacteriana de los extractos de mucílago y cáscara de café

Microorganismos	Concentración Mínima inhibitoria (MIC)						
	M	L1	L2	L3	L4	L5	Control (mg/mL)
<i>L. monocytogenes</i>	–	–	–	–	–	–	–
<i>B. cereus</i>	–	–	–	–	–	–	0,046
<i>S. aureus</i>	–	–	–	–	–	–	0,375
<i>E. coli</i>	–	–	–	–	–	–	0,023
<i>S. typhimurium</i>	–	–	–	–	–	–	0,023
<i>P. aeruginosa</i>	–	–	–	–	–	–	0,093

– No actividad bactericida, Control: Gentamicina

Los resultados de MIC en el cual se evaluaron concentraciones de (1.9, 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 mg/mL) y con un inóculo de 1.5×10^8 CFU/mL, no se evidenció actividad bactericida y bacteriostática. Posterior a la estandarización donde se evaluaron concentraciones de 1.5, 0.75, 0.375, 0.187, 0.093, 0.046, 0.023, 0.011 mg/mL no se evidenció actividad bactericida, pero si una inhibición moderada de crecimiento.

Con los resultados de la MIC del segundo ensayo se calcularon los porcentajes de inhibición para cada extracto frente a cada uno de los microorganismos evaluados (Figura 5 y 6). Luego se determinó la IC50 para cada extracto.

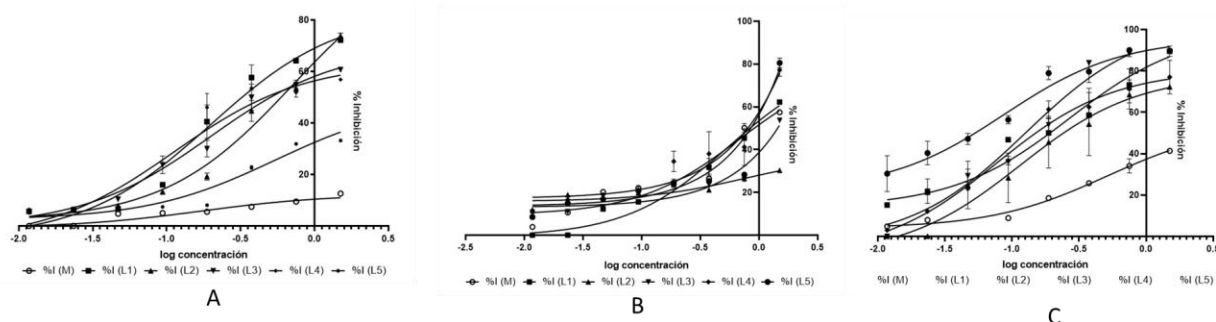


Figura 5. Curva dosis-respuesta de las bacterias Grampositivas: A) *Bacillus cereus* ATCC 14579. B) *Listeria monocytogenes* ATCC 13932. C) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente a los extractos.

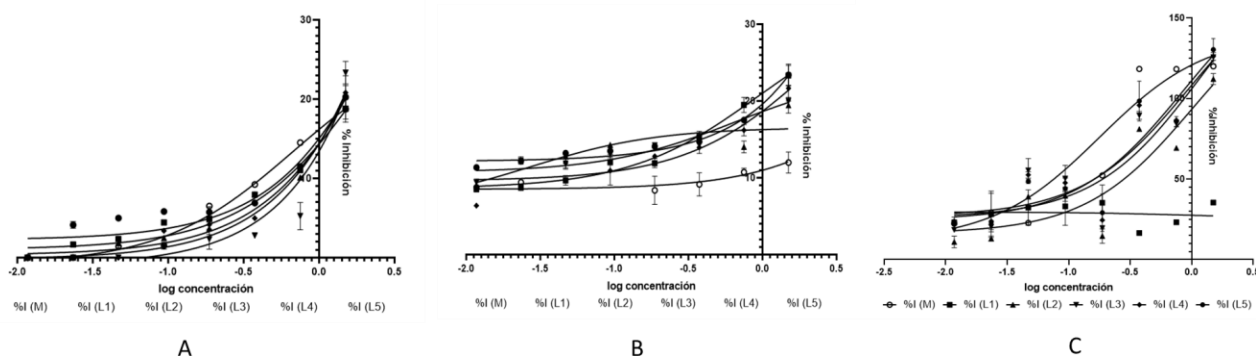


Figura 6. Curva dosis-respuesta de las bacterias Gramnegativas: A) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9017. B) *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. C) *Escherichia coli* ATCC 25922 frente a los extractos.

La actividad inhibitoria de los extractos varió dependiendo del microorganismo. Los extractos mostraron un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos Gram positivos (*B. cereus* ATCC 14579, *L. monocytogenes* ATCC 13932, *S. aureus* ATCC 6538), con porcentajes de inhibición superiores al 60%, mientras que no se observó tal efecto en las bacterias Gram negativas (*E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028, *P. aeruginosa* ATCC 9017), las cuales presentan porcentajes de inhibición menores al 60%. Para *L. monocytogenes*, el extracto que mostró el mayor porcentaje de inhibición fue CMC enriquecido 95:5 (L4) con concentraciones en un rango de 1,5 - 0,01 mg/mL mostrando porcentajes de inhibición del 40% y casi el 80%. *B. cereus* presentó mayor susceptibilidad frente CMC (L1) con porcentajes de inhibición hasta un 65%, mientras que para *S. aureus* el mejor fue CMC enriquecido 97:3 (L5) con porcentajes de inhibición desde el 45 % y casi el 90%. *P. aeruginosa* presentó más sensibilidad frente al extracto CMC enriquecido 90:10 (L3) con porcentajes de inhibición de casi el 30%, *S. typhimurium* frente L1 con porcentajes hasta casi el 26 % y finalmente para *E. coli* L4 con porcentajes de inhibición hasta el 60%.

3.3 Concentración media inhibitoria (IC50)

Posteriormente se determinó la IC₅₀, lo que dio como resultado para *L. monocytogenes* con el extracto CMC (L1) 0,539 mg/mL el cual obtuvo un IC₅₀ menor, seguido de el extracto de cáscara de café (M) con 0,683 mg/mL. Para *B. cereus*, CMC enriquecido 95:5 (L4) con 0,112 mg/mL y M (0,170 mg/mL), para *S. aureus* L4 (0,077 mg/mL) y CMC enriquecido 97:3 (L5) con 0,087 mg/mL. *S. typhimurium* el CMC enriquecido 80:20 (L2) con 0,026 mg/mL y CMC enriquecido 90:10 (L3) con 0,643 mg/mL, *P. aeruginosa* M (0,672 mg/mL), y para *E. coli* M (0,178 mg/mL) y L1 (0,838 mg/mL). Además, se logró determinar que la concentración del extracto afecta sobre el crecimiento de los microorganismos. Cuanto menor sea la concentración del extracto, menor será la inhibición.

4. Discusión

Los polifenoles son compuestos bioactivos conocidos por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas e antiinflamatorias. El ácido clorogénico es uno de los polifenoles más abundantes en el café, aunque el café también contiene muchos otros polifenoles como los ácidos ferúlico y cumárico, catequinas y flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, cumarina, tanino, estilbeno y lignanos (16). Esto explicaría el hecho de

que los extractos enriquecidos con granos de café tengan un mayor contenido total de polifenoles que de ácidos clorogénicos. Tabla 2.

En relación a la actividad antioxidante, se ha demostrado que el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante están altamente correlacionados (17), por lo que cuando aumenta el contenido de polifenoles totales en el café, también lo hace su actividad antioxidante. Lo anterior concuerda con los resultados, donde vemos que el CMC enriquecido 90:10 (L3) tiene el mayor contenido de polifenoles totales y la mayor actividad antioxidante. A excepción de los extractos CMC enriquecido 20:80 (L2) y el CMC (L1), donde L2 tiene un mayor contenido de polifenoles ($25,262 \pm 2,100$ mg GAE/mL) a L1, CMC enriquecido 95:5 (L4) y CMC enriquecido 93:7 (L5), pero tiene el valor ORAC más bajo de todos los extractos ($12.428,03 \pm 382,4$ μ mol Trolox/100 g de M//). Y L1 tiene un contenido de polifenoles menor a L5, pero una actividad antioxidante mayor que L5, L4 y L2. Esto puede deberse a la proporción de mucílago y de cáscara de café. Según la literatura, el ácido clorogénico tiene una actividad antioxidante significativa, aunque esta no es tan fuerte como otros polifenoles presentes en el café. Samsonowicz et. Al (2019) reportaron que la presencia de ácido gálico tenía un mayor impacto en la actividad antioxidante de infusiones de sustitutos de café que el ácido clorogénico. Lo que podría explicar por qué L2 tiene un alto CPT y una mayor proporción de ácido clorogénico, pero tiene una baja actividad antioxidante, lo que sugiere que no se ve afectado por altas concentraciones de ácido clorogénico. Por otro lado, L3 tiene una mayor actividad antioxidante que los otros extractos, lo que sugiere que el resto de los polifenoles totales que no corresponde a ácido clorogénico le aportan un mayor impacto. Aunque M tiene un alto contenido de ácido clorogénico, pero es el de menor CPT, esto puede deberse a la diferencia en la estructura química en la reactividad de cada compuesto fenólico con el reactivo de Folin- Ciocalteau, lo cual determina si pueden reaccionar como donador o no de electrones, influyendo en el poder reductor (18, 17).

Los métodos evaluados mostraron una mayor inhibición de los extractos frente a microorganismos Gram positivos. En cuanto a la difusión en disco, al comparar los resultados de la zona de inhibición se evidenció que todas las cepas analizadas fueron susceptibles al extracto de cáscara de café a una concentración de 100 mg/mL. Estos resultados pueden explicarse por el porcentaje de sólidos presentes en M (10,8%), que facilitó la difusión por el agar. Así mismo, a mayor contenido de mucílago será mayor contenido de sólidos y por tanto menor es la difusión, lo que explicaría por qué L3, L4 y L5 no presentaron zonas de inhibición. Se sabe que el diámetro de la zona de inhibición está relacionado con la velocidad de difusión de los agentes antibacterianos en agar, y que la sensibilidad de los microorganismos a la sustancia de prueba es más importante que el diámetro de la zona de inhibición (19). A pesar del alto contenido de sólidos del extracto L1, se observó inhibición frente a las cepas evaluadas, a excepción de *S. typhimurium*. Este hallazgo sugiere que, la proporción de mucílago presente en los extractos tiene un impacto directo en la sensibilidad de los microorganismos, además de que influye en la capacidad de difusión.

Los resultados obtenidos en los ensayos MIC y los cálculos de IC50 permitieron descartar la posibilidad de que los microorganismos no estuvieran respondiendo debido a la presencia de sólidos y no a los componentes activos, debido a que CMC enriquecido 90:10 (L3), CMC enriquecido 95:5 (L4) y CMC enriquecido 97:3 (L5) mostraron porcentajes de inhibición relativamente alto frente a ciertos microorganismos, como para *S. aureus*, el mejor extracto fue L5 con porcentajes de inhibición desde el 45 % hasta casi el 90% (Fig. 4.C). Por el contrario, *P. aeruginosa* presentó más susceptibilidad frente al extracto L3 con porcentajes de inhibición del hasta casi el 30% (Fig. 5. A), *S. typhimurium* frente CMC (L1) con porcentajes hasta casi el 26 % (Fig. 5. B), y para *E. coli* L4 con porcentajes de inhibición hasta el 60%. (Fig. 5.C). Esto indica que los extractos derivados de la cáscara y el mucílago de café podrían contener compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas. Aunque no se observó ningún efecto actividad bactericida, se observó una inhibición moderada del crecimiento para todas las cepas bacterianas evaluadas.

Los resultados también muestran que la adición de cáscara de café al mucílago de café (L2, L3, L4 y L5) resultó en un aumento en el contenido de ácido clorogénico y polifenoles totales, lo que puede explicar su mayor actividad antimicrobiana. Además, se encontró que el extracto L5 tiene el mayor porcentaje de inhibición para *L. monocytogenes*, lo que sugiere que la adición de cáscara de café en una proporción de 95:5 al mucílago de café podría ser beneficioso para la inhibición de esta bacteria al igual que para *S. aureus*.

La falta de actividad bactericida en nuestros resultados puede deberse al hecho de que se evaluaron concentraciones subinhibitorias de los extractos (1,5 - 0,011 mg/mL), lo que puede haber limitado su eficacia (20), informaron acerca del efecto antimicrobiano que tiene el extracto de *Coffea arábica*, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium*. Según el estudio, la concentración mínima de inhibición (MIC) fue de 2 mg/mL y 15 mg/mL respectivamente. (19). Por otra parte, se ha demostrado que una

concentración de 75 mg/ml de extractos de pulpa de café seca, (3) o 80 mg/ml de un extracto de café gastado (21) fueron necesarios para obtener inhibición en microorganismos gram negativos como *P. aeruginosa* y *E. coli*. Además, se ha reportado una concentración inhibitoria mínima del extracto para *B. cereus* de 0,6 mg/mL (22). Algunos de los resultados reportados son superiores a las concentraciones evaluadas de los extractos para la determinación de la MIC.

En relación con los valores de IC_{50} , estos indican la concentración de extracto necesaria para reducir el crecimiento microbiano en un 50%. Los valores más bajos indican una mayor eficacia del extracto en la inhibición del crecimiento (23). En este estudio, se observa que algunos extractos como el extracto de cáscara de café (M) para *B. cereus* (0,1122 mg/mL) y *S. aureus* (0,5106 mg/mL), tienen un IC_{50} relativamente bajo; lo que indica una fuerte actividad antimicrobiana. Por otro lado, algunos extractos como L4 para *P. aeruginosa* (11,52 mg/mL) y *L. monocytogenes* (14,82 mg/mL), tienen una IC_{50} relativamente alto, lo que indica una actividad antimicrobiana débil. Es importante destacar que los valores de IC_{50} no siempre se correlacionan directamente con la actividad antimicrobiana, ya que esta puede depender de múltiples factores, incluyendo la sensibilidad intrínseca de las cepas bacterianas evaluadas y la presencia de otros compuestos en el extracto que puede influir en su actividad (23).

Es interesante notar que los extractos más efectivos variaron según el microorganismo evaluado, lo que sugiere que la actividad antimicrobiana de los extractos está influenciada por las características específicas de cada microorganismo. Según estudios previos la composición específica de la estructura celular en Grampositivas es clave en la interacción con los compuestos extraídos. El efecto inhibitorio puede estar relacionado con diferencias en la constitución de la pared celular del microorganismo, o incluso con la actividad antioxidante de los radicales libres (19). Se sabe que los compuestos fenólicos tienen la capacidad de afectar la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos y modificar diversas funciones internas a través de la formación de enlaces de hidrógeno con las enzimas. Además, estos compuestos pueden alterar la rigidez de la pared celular, lo que puede provocar una pérdida de integridad de la membrana celular debido a diferentes interacciones (24). Como resultado de este proceso, la membrana citoplasmática puede sufrir daños irreversibles y el contenido celular puede coagularse, lo que lleva a la detención de las actividades enzimáticas y, en última instancia, a la muerte celular (24). Este mecanismo es menos probable que ocurra en las bacterias Gramnegativas debido a la conformación de la pared celular.

En general, estos resultados proporcionan información valiosa sobre la capacidad de diferentes extractos para inhibir el crecimiento microbiano y pueden ser útiles en el desarrollo de tratamientos antimicrobianos.

5. Conclusión

Los extractos de cáscara de café y mucílago de café evaluados en este estudio presentaron actividad antimicrobiana moderada contra los microorganismos estudiados, con una mayor actividad contra las bacterias Gram positivas. Los valores de IC_{50} indican que los extractos tienen un potencial para ser utilizados como agentes antibacterianos naturales. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar la actividad antibacteriana de estos extractos in vivo y su seguridad para su uso como conservante en la industria alimentaria.

En cuanto a la correlación entre las metodologías evaluadas, se observó una tendencia positiva en algunos casos. Por ejemplo, sustancias que generan grandes zonas de inhibición en la difusión en disco. También mostraron un porcentaje de inhibición alto en la MIC y un IC_{50} bajo, indicando una alta actividad antimicrobiana. Sin embargo, es importante tener en cuenta que pueden surgir discrepancias entre los resultados debido a que la difusión en disco y la MIC pueden estar influenciadas por la capacidad de difusión de la sustancia y la concentración real en el medio de cultivo. Por lo tanto, la correlación entre estas metodologías puede variar dependiendo de los microorganismos y las condiciones experimentales. En general, se recomienda utilizar estas metodologías en conjunto para obtener una evaluación más completa y precisa de la actividad antimicrobiana.

Bibliografía

1. FNC. Producción de café de Colombia cerró el 2019 en 14,8 millones de sacos. 2020.
2. Torres-Valenzuela LS, Ballesteros-Gómez A, Rubio S. Supramolecular solvent extraction of bioactives from coffee cherry pulp. J Food Eng [Internet]. 2020;278(January). Available from: <https://pdf.sciencedirectassets.com/271146/1-s2.0-S0260877420X00033/1-s2.0-S0260877420300327/main.pdf?X-Amz-Security->

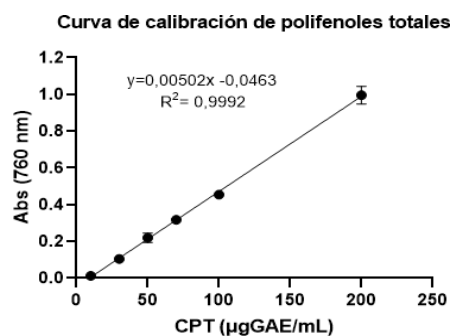
Token=IQoJb3JpZ2luX2VjEBAaCXVzLWVhc3QtMSJHMEUCIEDBuwH9bVl%2B1RW7qfjCVNzkaNfLUDtvWNYsSjH7Wo
grAiEAzqba4DWOPQg2CUgIVwK6CApeanb%2Bl68KGaTQs2v

3. 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. *Integr Med Res.* 2016 Dec 1;5(4):324–31.
4. OMS. Inocuidad de los Alimentos. 2020.
5. Thery T, Lynch KM, Zannini E, Arendt EK. Isolation, characterisation and application of a new antifungal protein from broccoli seeds – New food preservative with great potential. *Food Control* [Internet]. 2020;117(May):107356. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107356>
6. Sánchez NB. Control de calidad microbiológico y análisis de ácido ascórbico como bioconservante para producto elaborado a base de mango. *univ col mayor cundinamarca* [Internet]. 2019;561(3):S2–3. Available from: [https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3614/PROYECTO DE GRADO FINAL-3-70.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3614/PROYECTO_DE_GRADO_FINAL-3-70.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
7. Astuti SI, Arso SP, Wigati PA. Efecto antioxidante de la vitamina c (ácido ascórbico), vitamina e (tocoferoles) y aceite esencial de romero (*rosmarines officianalis*) para alargar la vida útil de alimentos procesados con alto contenido graso (salchichas de pollo) tesis. *Anal Standar Pelayanan Minimal Pada Instal Rawat Jalan di RSUD Kota Semarang* [Internet]. 2015;3:103–11. Available from: http://cybertesis.unsmm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/7813/Proaño_bj - Resumen.pdf?sequence=3&isAllowed=y
8. Ramón-Gonçalves M, Gómez-Mejía E, Rosales-Conrado N, León-González ME, Madrid Y. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. *Waste Manag.* 2019;96:15–24.
9. Chai B, Jiang WJ, Hu M, Wu Y, Si H. In vitro synergistic interactions of Protocatechuic acid and Chlorogenic acid in combination with antibiotics against animal pathogens. *Synergy* [Internet]. 2019;9:100055. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.synres.2019.100055>
10. Aguilar-Villalva R, Molina GA, España-Sánchez BL, Díaz-Peña LF, Elizalde-Mata A, Valerio E, et al. Antioxidant capacity and antibacterial activity from *Annona cherimola* phytochemicals by ultrasound-assisted extraction and its comparison to conventional methods. *Arab J Chem.* 2021 Jul 1;14(7):103239.
11. Rivera A, Viñado B, Benito N, Docobo-Pérez F, Fernández-Cuenca F, Fernández-Domínguez J, et al. Recommendations of the Spanish Antibiogram Committee (COESANT) for in vitro susceptibility testing of antimicrobial agents by disk diffusion. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed).* 2023 Jan 5;
12. Horna Quintana Gertrudis 1, Silva Díaz María 2, Vicente Taboada William 2 TOJ. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas [Internet]. *Revista Medica Herediana.* 2005 [cited 2023 Jun 1]. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007
13. Swinney DC. Molecular Mechanism of Action (MMoA) in Drug Discovery. *Annu Rep Med Chem.* 2011 Jan 1;46:301–17.
14. Del Rio D, Rodríguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013 May;18(14):1818.
15. Moreira MD, Melo MM, Coimbra JM, Reis KC dos, Schwan RF, Silva CF. Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. *Waste Manag.* 2018;82:93–9.
16. Bondam AF, Diolinda da Silveira D, Pozzada dos Santos J, Hoffmann JF. Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. *Trends Food Sci Technol.* 2022 May 1;123:172–86.
17. F. C. Padilla, A. M. Rincón LB-R. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces [Internet]. 2008 [cited 2023 May 8]. Available from: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2008/3/art-14/>
18. Samsonowicz M, Regulska E, Karpowicz D, Leśniewska B. Antioxidant properties of coffee substitutes rich in polyphenols and minerals. *Food Chem.* 2019 Apr 25;278:101–9.
19. Canci LA, de Toledo Benassi M, Canan C, Kalschne DL, Colla E. Antimicrobial potential of aqueous coffee extracts against pathogens and *Lactobacillus* species: A food matrix application. *Food Biosci.* 2022 Jun 1;47:101756.
20. Runti G, Pacor S, Colomban S, Gennaro R, Navarini L, Scocchi M. Arabica coffee extract shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* and low toxicity towards a human cell line. *LWT - Food Sci Technol.* 2015 Jun 1;62(1):108–14.
21. Monente C, Bravo J, Vitas AI, Arbillaga L, De Peña MP, Cid C. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *J Funct Foods.* 2015 Jan 1;12:365–74.
22. Chaves-Ulate C, Rodríguez-Sánchez C, Arias-Echandi ML, Esquivel P. Antimicrobial activities of phenolic extracts of coffee mucilage. *NFS J.* 2023 Jun 1;31:50–6.
23. Souiy Z, Al-Shaikh TM, Alghamdi OA, Krifi B. Optimization of extraction yield, chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut essential oils. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2023 Jan 1;47:102593.

24. Khochapong W, Ketnawa S, Ogawa Y, Punbusayakul N. Effect of in vitro digestion on bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extract. *Food Chem.* 2021 Jun 30;348:129094.

ANEXOS

Análisis de varianza



Best-fit values	
Slope	0.005175
Y-intercept	-0.04628
X-intercept	8.942
1/slope	193.2
Std. Error	
Slope	8.349e-005
Y-intercept	0.008237
95% Confidence Intervals	
Slope	0.004998 to 0.005352
Y-intercept	-0.06374 to -0.02882
X-intercept	5.717 to 12.01
Goodness of Fit	
R square	0.9959
Sy.x	0.02199
Is slope significantly non-zero?	
F	3842
DFn, DFd	1, 16
P value	<0.0001
Deviation from zero?	Significant
Replicates test for lack of fit	
SD replicates	0.02295
SD lack of fit	0.01886
Discrepancy (F)	0.6754
P value	0.6218
Evidence of inadequate model?	No
Equation	$Y = 0.005175 * X - 0.04628$
Data	
Number of X values	18
Maximum number of Y replicates	3
Total number of values	18
Number of missing values	0

Determinación del IC₅₀

B. cereus

Nonlin fit Table of results		A	B	C	D	E	F
		M	L1	L2	L3	L4	L5
1	log(inhibitor) vs. response (three parameters)						
2	Best-fit values						
3	Bottom	12.28	83.71	107.5	69.58	63.34	48.77
4	Top	-0.7599	-4.974	1.884	-0.2989	-5.775	2.387
5	LogIC50	-0.7695	-0.7021	-0.1480	-0.7060	-0.9498	-0.2655
6	IC50	0.1700	0.1985	0.7112	0.1968	0.1122	0.5426
7	Span	-13.04	-88.69	-105.6	-69.88	-69.11	-46.38
8	95% CI (profile likelihood)						
9	Bottom	9.428 to 17.27	74.84 to 94.76	90.20 to 138.4	63.45 to 77.05	50.80 to 82.19	34.26 to 92.20
10	Top	-3.222 to 0.8256	-14.23 to 3.054	-3.785 to 7.199	-6.090 to 4.921	-31.37 to 11.11	-4.960 to 8.724
11	LogIC50	-1.265 to -0.3077	-0.9205 to -0.4795	-0.3683 to 0.1169	-0.8934 to -0.5149	-1.471 to -0.4335	-0.7433 to 0.3475
12	IC50	0.05435 to 0.4924	0.1201 to 0.3315	0.4283 to 1.309	0.1278 to 0.3056	0.03382 to 0.3686	0.1806 to 2.226
13	Goodness of Fit						
14	Degrees of Freedom	13	12	11	14	8	6
15	R squared	0.9263	0.9690	0.9796	0.9743	0.8911	0.9317
16	Sum of Squares	17.70	349.6	193.8	207.5	531.0	77.41
17	Sy.x	1.167	5.398	4.198	3.850	8.147	3.592

S. typhimurium

Nonlin fit Table of results		A	B	C	D	E	F
		M	L1	L2	L3	L4	L5
1	log(inhibitor) vs. response (three parameters)						Ambiguous
2	Best-fit values						
3	Bottom	46.28	32.45	16.55	23.71	39.63	~ 7490
4	Top	8.502	8.601	6.274	10.72	9.607	12.14
5	LogIC50	1.154	-0.03567	-1.570	-0.1918	0.3647	~ 3.001
6	IC50	14.26	0.9211	0.02691	0.6430	2.316	~ 1001
7	Span	-37.78	-23.85	-10.27	-13.00	-30.02	~ -7478
8	95% CI (profile likelihood)						
9	Bottom	???	26.63 to 47.3	14.74 to ???	19.87 to 66.5	20.91 to ???	(Very wide)
10	Top	6.148 to 10.1	7.269 to 9.79	???	9.148 to 11.9	6.999 to 11.6	???
11	LogIC50	-1.731 to ???	-0.3435 to 0.3	???	-0.6930 to 0.5	-0.5913 to ??	(Very wide)
12	IC50	0.01856 to ??	0.4534 to 2.3	???	0.2028 to 8.1	0.2563 to ???	(Very wide)
13	Goodness of Fit						
14	Degrees of Freedom	8	17	13	13	14	15
15	R squared	0.4620	0.9489	0.7402	0.9107	0.8174	0.9437
16	Sum of Squares	18.66	27.64	39.38	15.49	67.54	16.84
17	Sy.x	1.527	1.275	1.741	1.091	2.196	1.059

P. aeruginosa

Nonlin fit Table of results		A	B	C	D	E	F
		M	L1	L2	L3	L4	L5
	log(inhibitor) vs. response (three parameters)				Ambiguous		
	Best-fit values						
	Bottom	27.61	50.36	103.3	~ 437284	182.1	92.86
	Top	-0.8350	1.034	0.3185	-0.9900	-0.1872	2.244
	LogIC50	-0.1725	0.4335	0.7991	~ 4.482	1.061	0.7842
	IC50	0.6723	2.714	6.297	~ 30348	11.52	6.085
	Span	-28.44	-49.33	-102.9	~ -437285	-182.3	-90.62
	95% CI (profile likelihood)						
	Bottom	23.18 to 35.69	27.26 to ???	45.28 to ???	(Very wide)	47.48 to ???	29.13 to ???
	Top	-1.916 to 0.1917	-0.1867 to 2.197	-0.4335 to 1.047	???	-1.366 to 0.9109	0.3517 to 3.913
	LogIC50	-0.3912 to 0.09384	-0.05486 to ???	0.3065 to ???	(Very wide)	0.3017 to ???	-0.04533 to ???
	IC50	0.4062 to 1.241	0.8813 to ???	2.025 to ???	(Very wide)	2.003 to ???	0.9009 to ???
	Goodness of Fit						
	Degrees of Freedom	12	14	14	17	15	12
	R squared	0.9834	0.9616	0.9823	0.9087	0.9652	0.9339
	Sum of Squares	14.21	29.39	12.78	85.00	36.35	47.89
	Sy.x	1.088	1.449	0.9555	2.236	1.557	1.998

S.aureus

Nonlin fit Table of results		A	B	C	D	E	F
		M	L1	L2	L3	L4	L5
1	log(inhibitor) vs. response (three parameters)						
2	Best-fit values						
3	Bottom	54.34	99.81	78.20	103.4	80.50	95.72
4	Top	3.934	14.09	-9.503	-3.326	-9.225	22.14
5	LogIC50	-0.2919	-0.5742	-0.9397	-0.8990	-1.111	-1.059
6	IC50	0.5106	0.2665	0.1149	0.1262	0.07752	0.08734
7	Span	-50.41	-85.72	-87.70	-106.7	-89.73	-73.58
8	95% CI (profile likelihood)						
9	Bottom	42.02 to 87.18	86.28 to 124.9	60.82 to 106.1	85.07 to 132.1	69.06 to 95.19	88.24 to 104.5
10	Top	-2.767 to 9.856	2.759 to 23.68	-40.03 to 8.389	-21.01 to 8.660	-38.05 to 8.941	7.908 to 32.72
11	LogIC50	-0.7186 to 0.2303	-0.9634 to -0.1547	-1.500 to -0.4061	-1.277 to -0.5188	-1.552 to -0.7193	-1.359 to -0.7703
12	IC50	0.1912 to 1.700	0.1088 to 0.7003	0.03164 to 0.3926	0.05283 to 0.3028	0.02804 to 0.1909	0.04379 to 0.1697
13	Goodness of Fit						
14	Degrees of Freedom	7	8	19	11	12	17
15	R squared	0.9546	0.9704	0.7952	0.9527	0.9072	0.9251
16	Sum of Squares	84.19	257.0	3850	611.0	1006	813.8
17	Sy.x	3.468	5.668	14.24	7.453	9.158	6.919

E.coli

Table of results	%I (M)	%I (L1)	%I (L2)	%I (L3)	%I (L4)	%I (L5)
log(inhibitor) vs. response (three parameters)						
Best-fit values						
Bottom	140.3	25.80	170.9	201.5	185.5	185.3
Top	11.54	29.46	16.14	25.93	26.82	24.33
LogIC50	-0.7494	-0.07632	0.002828	0.07632	-0.02354	-0.06859
IC50	0.1781	0.8388	1.007	1.192	0.9472	0.8539
Span	-128.8	3.660	-154.7	-175.5	-158.6	-161.0
95% CI (profile likelihood)						
Bottom	121.3 to 167.3	24.01 to 33.63	108.3 to ???	123.0 to ???	125.4 to 1128	128.4 to 674.0
Top	-8.028 to 27.02	24.01 to 33.63	1.983 to 28.39	10.50 to 39.32	12.72 to 39.26	9.785 to 37.12
LogIC50	-1.146 to -0.3950	???	-0.5648 to ???	-0.5381 to ???	-0.5415 to 1.181	-0.5616 to 0.8885
IC50	0.07148 to 0.4027	???	0.2724 to ???	0.2897 to ???	0.2874 to 15.18	0.2744 to 7.736
Goodness of Fit						
Degrees of Freedom	12	17	21	21	21	21
R squared	0.9365	0.005208	0.8047	0.7807	0.8124	0.8282
Sum of Squares	1989	1805	5605	7186	5895	5920
Sy.x	12.88	10.30	16.34	18.50	16.75	16.79

L. monocytogenes

Nonlin fit Table of results		A	B	C	D	E	F
		M	L1	L2	L3	L4	L5
1	log(inhibitor) vs. response (three parameters)				Ambiguous		Ambiguous
2	Best-fit values						
3	Bottom	80.49	82.67	37.46	~ 275004	654.6	~ 667452
4	Top	9.371	-0.7104	15.81	13.06	17.22	13.55
5	LogIC50	-0.1650	-0.2678	-0.1129	~ 4.031	1.171	~ 4.193
6	IC50	0.6838	0.5398	0.7710	~ 10743	14.82	~ 15594
7	Span	-71.12	-83.38	-21.65	~ -274991	-637.4	~ -667438
8	95% CI (profile likelihood)						
9	Bottom	62.11 to 127.7	70.49 to 101.7	26.55 to ???	(Very wide)	87.66 to ???	(Very wide)
10	Top	3.436 to 14.3	-4.288 to 2.61	6.238 to 19.5	???	8.564 to 23.3	???
11	LogIC50	-0.5541 to 0.3	-0.4840 to -0.1	-1.497 to ???	(Very wide)	-0.2287 to ??	(Very wide)
12	IC50	0.2792 to 2.0	0.3281 to 0.9	0.03181 to ??	(Very wide)	0.5906 to ???	(Very wide)
13	Goodness of Fit						
14	Degrees of Freedom	16	15	6	16	17	13
15	R squared	0.9279	0.9816	0.8858	0.9144	0.8453	0.9516
16	Sum of Squares	441.2	176.5	33.77	310.4	1476	460.7
17	Sy.x	5.251	3.431	2.372	4.404	9.319	5.953