



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE CASCARILLA DE CAFÉ  
FERMENTADA CON *Pleurotus pulmonarius* SOBRE LA  
ESTABILIDAD OXIDATIVA Y MICROBIOLÓGICA DE CARNE  
DE CERDO MOLIDA**

---

Por:

**Stephany Carolina Terán Rivera**

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Stephany Carolina Terán Rivera la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



---

Dr. Rey David Vargas Sánchez  
Director de Tesis



---

Dra. Armida Sánchez Escalante  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Gaston R. Torrescano Urrutia  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Martín C. Esqueda Valle  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Efecto de la Adición de Cascarilla de Café Fermentada con *Pleurotus pulmonarius* sobre la Estabilidad Oxidativa y Microbiológica de Carne de Cerdo Molida" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Stephany Carolina Terán Rivera, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para realizar mi maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por prestarme sus instalaciones para poder desarrollar mi proyecto de investigación.

A los doctores que formaron parte de mi comité de tesis: Dr. Rey David Vargas Sánchez, Dra. Armida Sánchez Escalante, Dr. Gastón R. Torrescano Urrutia y al Dr. Martín C. Esqueda Valle, a todos ustedes muchas gracias por aceptar ser mis asesores, por sus consejos y ayudarme a sacar adelante este proyecto.

A mi hermano Fernando por brindarme su apoyo cuando lo necesito.

A mi hermana Wendy por siempre estar, por escucharme, darme consejos y brindarme su apoyo siempre.

A mi esposo Arnoldo por siempre escuchar mis frustraciones y darme ánimos.

A la guardería Lactantitos y Mil sonrisas por ser una segunda casa para mi hija, por su confianza y su apoyo cuando aún no recibía mi beca.

A mis compañeros de laboratorio Wendy Alejandra Atondo Echeagaray, José Antonio Díaz Rangel y Brisa del Mar Torres Martínez por su apoyo técnico en cada una de las etapas experimentales.

Por último, un especial agradecimiento al Dr. Rey David Vargas Sánchez por ayudarme a sacar adelante mi proyecto de investigación, por siempre estar disponible para cualquier duda, por aceptar ser mi asesor en segundo semestre, por sus consejos y por su empatía y comprensión, es un excelente Doctor.

## **DEDICATORIA**

A mi preciosa hija Leonor,  
te amo y eres desde el comienzo mi mayor motivación  
para llevar esto a cabo.

Gracias a tu rápido aprender y la adaptación que tienes  
me ayudaste a salir adelante y tomarme tiempo para mis clases y trabajos,  
solo tú y yo sabemos lo que nos costó llevar a cabo mi maestría

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	16
2.1. Producción de Café en México.....	16
2.2. Procesamiento del Fruto de Café.....	17
2.3. Residuos del Procesamiento del Fruto de Café .....	19
2.4. Composición Química de los Residuos de Café.....	20
2.5. Métodos de Extracción de Compuestos Bioactivos .....	21
2.6. Propiedad Antioxidante y Antimicrobiana de Extractos obtenidos de Residuos de Café.....	22
2.7. Antioxidantes y Antimicrobianos de Residuos de Café para Carne y Productos Cárnicos .....	25
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	29
4.1 Objetivo General.....	29
4.2 Objetivos Específicos .....	29
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
5.1. Residuo Agroindustrial.....	30
5.2. Obtención de los Extractos Acuosos .....	30
5.3. Contenido de Metabolitos de los Extractos Acusoso .....	31
5.4. Actividad Antioxidante de los Extractos .....	32
5.5. Actividad Antimicrobiana de los Extractos.....	33
5.6. Actividad Antioxidante de los Extractos en Homogenizados de Carne de Cerdo .....	34
5.7. Actividad Antimicrobiana de los Extractos en Homogenizados de Carne de Cerdo .....	35
5.8. Análisis Estadístico .....	35
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	36
6.1. Contenido de Metabolitos de los Extractos Obtenidos por EAM y FML .....	36
6.2. Actividad Antioxidante de los Extractos Obtenidos por EAM y FML .....	38
6.3. Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos por EAM y FML.....	40

## CONTENIDO (continuación)

6.4. Actividad Antioxidante y Antimicrobiana de los Extractos en Homogenizados de Carne de Cerdo.....	42
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	59
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	60

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Distribución geográfica de los principales estados productores de café en México.....	17
2. Representación esquemática del corte transversal del fruto de café .....	18
3. Representación esquemática del proceso y de los residuos generados del café .....	19
4. Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de metabolitos.....	37
5. Valores de pH del homogenizado de carne de cerdo adicionado con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio .....	43
6. Valores de TBARS del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio .....	45
7. Curva de calibración para la cuantificación de malondialdehído (MDA) .....	46
8. Valores de L* del homogenizado de carne de cerdo adicionado con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio .....	48
9. Valores de a* del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio .....	49
10. Valores de b* del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.....	50
11. Valores de C* del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.....	51
12. Valores de h* del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.....	52
13. Valores de MetMb del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.....	53
14. Curva de calibración para la cuantificación de metamioglobina (MetMb).....	54
15. Cuenta total de mesófilos aerobios del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio .....	56
16. Cuenta total de psicrófilos aerobios del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio. ....	57

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Actividad antioxidante de extractos obtenidos de residuos de café.....	23
2. Uso de los residuos de café como aditivo antioxidante para carne y productos cárnicos .....	24
3. Uso de los residuos de café como conservador para carne y productos cárnicos.....	27
4. Contenido de metabolitos del extracto acuoso de cascarilla de café obtenido por EAM y FML .....	36
5. Actividad antioxidante del extracto acuoso de cascarilla de café obtenido por EAM y FML .....	39
6. Actividad antimicrobiana del extracto acuoso de cascarilla de café obtenido por EAM y FML .....	41

## RESUMEN

La industria del café genera grandes cantidades de residuos que, en su mayoría, son subproductos derivados de la obtención del grano café (cáscara, pulpa, cascarilla o piel plateada) y del consumo de la bebida (bagazo). No obstante, se ha demostrado que la cascarilla de café es una fuente importante de compuestos antioxidantes y antimicrobianos. Por lo que, la extracción de estos compuestos es una estrategia para la obtención de nuevos aditivos conservadores para carne y productos cárnicos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del extracto acuoso obtenido de la cascarilla de café fermentada en medio líquido con *Pleurotus pulmonarius* sobre la estabilidad oxidativa y microbiológica de carne de cerdo molida. Por lo que, se obtuvieron extractos acuosos por extracción-asistida por maceración (EAM-0%, EAM-1.5% y EAM-3.0%, medio de cultivo + 0, 1.5 y 3.0% de cascarilla de café, respectivamente) y fermentación fúngica en medio líquido (FML-0%, FML-1.5% y FML-3.0%, medio de cultivo + micelio de *P. pulmonarius* + 0, 1.5 y 3.0% cascarilla de café, respectivamente). El contenido total de carbohidratos, fenoles, flavonoides y ácido cafeoilquínico; así como actividad antirradical (DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>, y poder reductor) y actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*) fue determinado. Además, se evaluó el efecto de los extractos sobre la estabilidad oxidativa (pH, color, formación de metamioglobina y oxidación de lípidos) y microbiológica (cuenta total de mesófilos y psicrófilos aerobios) en carne molida pro-oxidada (0, 0.5 y 1% ferrocianuro de potasio). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y una prueba de Tukey-Kramer (p<0.05). Los resultados mostraron que el mayor contenido de carbohidratos lo presentó EAM-0%, mientras que el mayor contenido de fenoles, flavonoides y ácido cafeoilquínico total lo mostró FML-3.0% (p<0.05). EAM-3.0% exhibió la mayor inhibición del radical DPPH<sup>•</sup>, mientras que FML-3.0% mostró la mayor inhibición del radical ABTS<sup>•+</sup> y poder reductor (p<0.05). EAM-1.5% y EAM-3.0% presentaron mayor efecto frente *S. aureus* y *L. monocytogenes*, EAM-1.5%, EAM-3.0% y FML-3.0% frente *E. coli*, y EAM-3.0%, FML-0%-FML-3.0% frente *S. typhimurium*. Además, la incorporación (FML > EAM) al homogenizado de carne de cerdo, redujo los cambios en los valores de pH, oxidación de lípidos, color, formación de metamioglobina y crecimiento microbiano (p<0.05). En conclusión, los extractos obtenidos por fermentación fúngica poseen gran potencial como antioxidante y

antimicrobiano natural para carne y productos cárnicos.

**Palabras clave:** Residuos agroindustriales, fermentación fúngica, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, *Pleurotus pulmonarius*, productos cárnicos.

## ABSTRACT

The coffee industry generates large amounts of waste that, for the most part, are by-products derived from obtaining the coffee bean (peel, pulp, husk or silverskin) and the consumption of the beverage (bagasse). However, coffee hulls have been shown to be an important source of antioxidant and antimicrobial compounds. Therefore, the extraction of these compounds is a strategy to obtain new preservative additives for meat and meat products. Therefore, the objective of this work was to determine the effect of the aqueous extract obtained from fermented coffee silverskin in a liquid medium with *Pleurotus pulmonarius* on the oxidative and microbiological stability of ground pork meat. Therefore, aqueous extracts were obtained by maceration-assisted extraction (EAM-0%, EAM-1.5% and EAM-3.0%, culture medium + 0, 1.5 and 3.0% of coffee silverskin, respectively) and fungal fermentation in liquid medium (FML-0%, FML-1.5% and FML-3.0%, culture medium + mycelium of *P. pulmonarius* + 0, 1.5 and 3.0% coffee silverskin, respectively). The total content of carbohydrates, phenols, flavonoids and caffeoylquinic acid; as well as antiradical activity (DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>, and reducing power) and antimicrobial activity against pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*) was determined. In addition, the effect of the extracts on oxidative (pH, color, metmyoglobin formation, and lipid oxidation) and microbiological (total count of aerobic mesophiles and psychrophiles) stability in pro-oxidized ground beef (0, 0.5, and 1% potassium ferrocyanide) was evaluated. The data obtained were subjected to an analysis of variance and a Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ). The results showed that the highest carbohydrate content was presented by EAM-0%, while the highest total content of phenols, flavonoids and caffeoylquinic acid was showed by FML-3.0% ( $p < 0.05$ ). EAM-3.0% exhibited the highest inhibition of the DPPH<sup>•</sup> radical, while FML-3.0% showed the highest inhibition of the ABTS<sup>•+</sup> radical and reducing power ( $p < 0.05$ ). EAM-1.5% and EAM-3.0% had a greater effect against *S. aureus* and *L. monocytogenes*, EAM-1.5%, EAM-3.0% and FML-3.0% against *E. coli*, and EAM-3.0%, FML-0% -FML-3.0% against *S. typhimurium*. In addition, the incorporation (FML > EAM) to the pork meat homogenate reduced changes in pH values, lipid oxidation, color, metmyoglobin formation and microbial growth ( $p < 0.05$ ). In conclusion, the extracts obtained by fungal fermentation have great potential as a natural antioxidant and antimicrobial for meat and meat products.

**Keywords:** Agro-industrial residues, fungal fermentation, antioxidant activity, antimicrobial activity, *Pleurotus pulmonarius*, meat products.

## 1. INTRODUCCIÓN

El café es una planta perenne tropical perteneciente al género *Coffea* de la familia Rubiaceae, la cual incluye más de 30 especies. En México, el cultivo de esta planta emplea a más de 500 mil productores de 14 entidades federativas y con fines comerciales se producen dos variedades principalmente, la especie robusta (*Coffea robusta* L.) y arábica (*Coffea arabica* L.) (SAGARPA, 2017). También, se denomina café a la bebida que se prepara con ellas al mezclar el fruto (tostado y molido) con agua caliente (SAGARPA, 2017; Mussatto *et al.*, 2011).

La industria del café libera grandes cantidades de residuos que, en su mayoría, son subproductos derivados de la obtención del grano café y del consumo de la bebida. Estos residuos agroindustriales representan un enorme problema ambiental, debido a la presencia de material orgánico que requiere grandes cantidades de oxígeno para ser degradado (Campos-Vega *et al.*, 2015; Morthy y Naidu, 2012a; Mussatto *et al.*, 2011). En contraste, se ha demostrado que los residuos del café son una fuente importante de nutrientes y compuestos bioactivos, a los cuales se les atribuyen diversas propiedades biológicas (Mussatto *et al.*, 2011).

Diversos trabajos de investigación enfatizan el aprovechamiento y recuperación de compuestos bioactivos a partir de residuos de café mediante diversos métodos de extracción (convencionales y no convencionales). Por ejemplo, en un estudio se demostró la presencia de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos acuosos de pulpa de café, obtenidos por el método de maceración (Duangjai *et al.*, 2016). Mientras que, en otra investigación se reportó la presencia de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de extractos acuosos y metanólicos (80%) obtenidos de cascarilla de café por ultrasonido, siendo estos más efectivos que los extractos obtenidos por el método de maceración (Wen *et al.*, 2019)

Adicionalmente, la extracción asistida por fermentación fúngica en medio sólido (FMS) y medio líquido (FML) es considerada un método eficiente para la producción y obtención de compuestos bioactivos, debido al mayor aprovechamiento del residuo y altos rendimientos de extracción (Martins *at al.*, 2011). Además, la FML tiene potencial ventaja respecto al cultivo en medio sólido, debido a que permite uniformidad en la dispersión del inóculo en el sustrato y reducción del tiempo, sin embargo, esto dependerá de la especie de microorganismos utilizada, del sustrato y de las condiciones de cultivo (pH, temperatura, aireación, otros) (Dey *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2015). En

este contexto, mediante fermentación fúngica en medio líquido utilizando *Pleurotus pulmonarius*, se recuperaron compuestos con actividad antioxidante a partir de piel de piña, mango y plátano (Ogidi *et al.*, 2020). Por ello, la fermentación fúngica se ha propuesto como una estrategia para la obtención de ingredientes antioxidantes y antimicrobianos a partir de fuentes naturales para prevenir reacciones de oxidación en los alimentos (Ogidi *et al.*, 2020; Rosales *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2002).

Las reacciones de oxidación de lípidos y la contaminación microbiana son considerados los factores más importantes que repercuten en la calidad nutritiva y sensorial de los alimentos, incluyendo a la carne y productos cárnicos, provocando pérdidas y aceptabilidad del producto (Ribeiro *et al.*, 2019; Papu *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que estas reacciones promueven la formación de compuestos que pueden ser tóxicos para el consumidor, mientras que, la contaminación microbiana se asocia a enfermedades transmitidas por alimentos. Por esta razón, algunas estrategias utilizadas para evitar el daño oxidativo de la carne y productos cárnicos son el uso de la cadena de frío (refrigeración), envasado (vacío y atmósferas modificadas), la incorporación de aditivos como los antioxidantes y antimicrobianos comercialmente disponibles (butilhidroxianisol, BHA; butilhidroxitolueno, BHT; terbutilhidroquinona, TBHQ), entre otros (Papu *et al.*, 2017; Falowo *et al.*, 2014). Sin embargo, el uso no controlado de los antioxidantes y antimicrobianos sintéticos puede provocar efectos en la salud del consumidor, en consecuencia, se han realizado esfuerzos para obtener antioxidantes de fuentes naturales, a través de métodos convencionales y no convencionales, capaces de preservar la carne y productos cárnicos (Ramírez-Rojo *et al.*, 2018).

En base a los resultados obtenidos en estudios previos, se sabe que es reducido el número de investigaciones enfocadas al aprovechamiento de residuos de la industria del café y de la obtención de compuestos antioxidantes y antimicrobianos mediante extracción asistida por fermentación fúngica, así como el uso potencial de estos compuestos como aditivos en alimentos. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antioxidante y antimicrobiano del extracto acuso de cascarilla de café obtenido por FML con *Pleurotus pulmonarius* sobre la estabilidad oxidativa de carne de cerdo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Producción de Café en México

Para la producción de la planta de café o cafeto se requieren ciertas condiciones geográficas (limitada a los Trópicos de Cáncer y de Capricornio) y ambientales especiales, de estas últimas podemos hacer mención de la temperatura (17-26 °C), altura (900-1600 m.s.n.m.), vientos (<30 km/h), lluvias (1000-3000 mm/año) y humedad (>90%). En este contexto, el mayor productor de café a nivel mundial en el año 2011 fue Brasil, seguido de Vietnam, Indonesia, Colombia, Etiopía, Perú, India, Honduras, México y Guatemala. En México, esta planta llegó al país en el año 1790 a la región de Córdoba Veracruz, y posteriormente en el año 1823 se introdujo al estado de Michoacán. Mientras que, en 1847 se introdujeron plantas de café al estado de Chiapas (Figueroa-Hernández *et al.*, 2011).

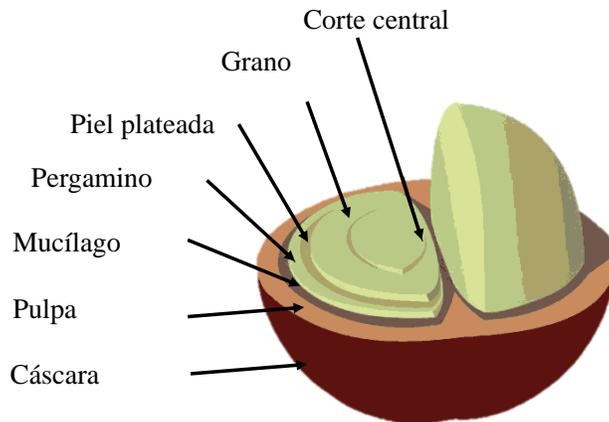
Hoy en día, en este país se producen alrededor de 820 mil toneladas (Mt) de este grano y se consumen alrededor de 810 Mt, lo que indica que se satisface alrededor del 100% del consumo nacional; mientras que el consumo per cápita es de 1.3 kg. Los principales estados productores (**Figura 1**) son Chiapas (355 Mt), seguido por Veracruz (209.8 Mt), Puebla (135.7 Mt), Oaxaca (0.75 Mt) y Guerrero (0.39 Mt). En relación al balance comercial (exportaciones e importaciones), para el año 2016, se reportó un volumen aproximado de 80 y 66 Mt para el año 2016, respectivamente, siendo Estados Unidos (43.7 Mt), España (9.7 Mt), Bélgica (8.1 Mt), Alemania (3.5 Mt), Canadá (3.3 Mt) y Cuba (2.5 Mt), los principales destinos de las exportaciones del café mexicano. Mientras que, los países de los cuales se importó café fueron Vietnam (24.6 Mt), Brasil (14.9 Mt), Honduras (11.44 Mt), Uganda (2.4 Mt), Colombia (1.8 Mt) y Perú (1.7 Mt) (SAGARPA, 2017).



**Figura 1.** Distribución geográfica de los principales estados productores de café en México (SAGARPA, 2017).

## 2.2. Procesamiento del Fruto de Café

En muchas partes del mundo, los frutos maduros del café son generalmente procesados en los mismos lugares donde se producen, los cuales pasan por una serie de operaciones que tienen por objeto sustraer a los granos de su envoltura original (pulpa, mucílago y otros compuestos) para obtener un grano comestible de buena calidad (Morthy y Naidu, 2012a; Mussatto *et al.*, 2011). La cereza de café se compone de dos granos cubiertos por un pergamino delgado como una cáscara, los cuales están rodeados de pulpa (**Figura 2**). El fruto o cerezo se cosecha cuando este se vuelve rojo. Mientras que, su procesamiento da inicio con la conversión del fruto de café en granos de café verde (eliminación de la pulpa y cáscara), siendo el método húmedo y seco los métodos básicos utilizados para realizar este procesamiento (Mussatto *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Representación esquemática del corte transversal del fruto de café. Adaptada de Janissen y Huynh (2018).

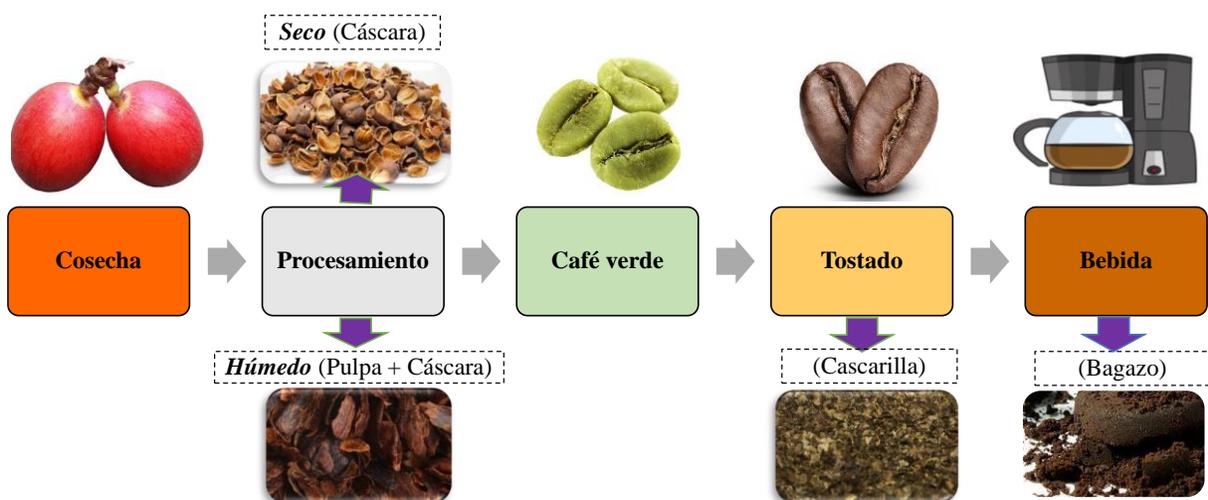
El café procesado mediante el primer método se le conoce como café lavado o pergamino, y en este método la pulpa del fruto que cubre la semilla es removida antes del secado, con el fin de eliminar el mucílago de la cubierta del pergamino. Además, se lleva a cabo un proceso de fermentación microbiana (30-35 °C; 24-36 h para arábica y 72 h para robusta; agitación 2-3 veces por periodo) para descomponer la capa de mucílago del pergamino en sustancias simples no pegajosas, proceso que dependerá de las enzimas pectinolíticas. El proceso termina al garantizar a través del tacto que el pergamino no se pegará después del lavado (Murthy y Naidu, 2012a; Mussatto *et al.*, 2011).

En el segundo método los frutos recién cosechados se esparcen uniformemente para ser secados a temperatura ambiente durante 12-15 días, estos granos son agitados una vez cada día, y el fruto se considera que está seco cuando al agitar varias semillas producen un sonido de traqueteo. Posteriormente, los frutos secos se almacenan para evitar exponerse a condiciones húmedas y evitar la formación de moho (Murthy y Naidu, 2012a).

También, el tostado de los granos de café es otro paso importante para su procesamiento (etapa que depende del tiempo y temperatura), ya que en esta etapa se desarrollan sus propiedades organolépticas (color, sabor y aroma), las cuales pueden afectar la calidad del café y de su bebida. Este proceso conduce a cambios en la composición química y actividad biológica, por lo que el enfriado después del tostado es una etapa crítica en la que se detienen reacciones exotérmicas. Posteriormente, los granos tostados son envasados enteros o pulverizados (Mussatto *et al.*, 2011).

### 2.3. Residuos del Procesamiento del Fruto de Café

El proceso del café inicia con la eliminación de los componentes externos del fruto o cereza del café, hasta obtener el grano de café verde (**Figura 3**). El método húmedo se usa principalmente para Arábica y produce pulpa como subproducto, mientras que el método seco, se usa comúnmente para Robusta y se obtiene como subproducto a la cáscara. La cereza de café está compuesta en un 50% que corresponde a la semilla, el 1.2% lo compone el residuo conocido como piel plateada o cascarilla (principal subproducto del proceso de tostado), el 41% son residuos de mucílago/pulpa/pergamino, y del 7-8% lo conforma la cáscara o piel. La pulpa y la cáscara son el primer subproducto del proceso industrial, y por cada tonelada de café procesado se obtienen 0.5 y 0.18 ton de residuos, respectivamente. Mientras que, el segundo subproducto es la cascarilla, la cual es el tegumento del grano de café (Janissen y Huynh, 2018; Mussatto *et al.*, 2011). Adicionalmente, considerando que la bebida de café es el segundo producto comercial más importante en el mundo, durante su preparación se generan una gran cantidad de residuos. El grano de café representa un 50% del peso seco del fruto y este una vez tostado-molido se trata con calor o vapor para producir un extracto, el residuo que queda después de la extracción se conoce como bagazo de café (Janissen y Huynh, 2018).



**Figura 3.** Representación esquemática del proceso y de los residuos generados del café. Adaptada de Murthy y Naidu (2012).

## 2.4. Composición Química de los Residuos de Café

Los residuos de la industria de café se componen principalmente de agua, compuestos nitrogenados (proteínas y aminoácidos libres, cafeína, etc.), lípidos (cera y aceite), minerales y carbohidratos (solubles e insolubles). Este contenido depende del procesamiento del fruto crudo (método húmedo o seco, tostado) y del fruto procesado mediante la preparación de la bebida (Janissen y Huynh, 2011). En relación con el contenido de aminoácidos se reporta en residuos al ácido glutámico y aspártico, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, cisteína, tirosina, valina, metionina, lisina, isoleucina, leucina y fenilalanina (Tang *et al.*, 2021). Mientras que, el ácido palmítico y linoleico son los principales ácidos grasos identificados en estos subproductos (Mussato *et al.*, 2011). Respecto al contenido de minerales, se incluye la presencia de potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro, manganeso, zinc, cobre, cadmio, entre otros. En tanto que, de los carbohidratos solubles, se ha reportado la presencia de monosacáridos (fructosa, glucosa, galactosa, etc.), oligosacáridos (sucrosa, rafinosa y estaquiosa) y polisacáridos (polímeros de galactosa, arabinosa, manosa, etc.). Mientras que, la fracción insoluble está compuesta de celulosa y hemicelulosa (Murthy y Naidu, 2012a; Janissen y Huynh, 2011; Mussato *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se ha reportado la presencia de ciertos ácidos alifáticos no volátiles (ácido cítrico, ácido málico y ácido quínico), y se han identificado compuestos fenólicos, incluyendo a los ácidos fenólicos y flavonoides (Mussato *et al.*, 2011). Los ácidos clorogénicos (mono-, dicafeoil-, y feruloilquínico), *p*-cumárico, ferúlico, gálico, protocatecuico, siríngico y vinílico, han sido previamente reportados en residuos de café (Ameca *et al.*, 2018; Murthy y Naidu, 2012b). Además, ésteres de ácidos fenólicos han sido identificados, entre ellos el ácido 3-cumaroilquínico, 5-cumaroilquínico, 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 4 feruloilquínico y 5 feruloilquínico (Bresciani *et al.*, 2014). Mientras que, los flavonoides crisantemina, quercetina y rutina fueron también identificados en estos residuos (Angeloni *et al.*, 2020). También, los taninos son compuestos fenólicos presentes en estos residuos (Janissen y Huynh, 2011).

## 2.5. Métodos de Extracción de Compuestos Bioactivos

Los compuestos bioactivos (compuesto químico que ejerce un efecto benéfico para la salud) comúnmente se encuentran en fuentes naturales como mezclas de diferentes componentes en un sólido, por esta razón, para su extracción o separación de la fase sólida se utiliza una fase líquida (extracción sólido-líquido). Para incrementar la extracción de estos compuestos es necesario pre-tratar el material sólido, secando y reduciendo el tamaño de partícula (Azmir *et al.*, 2013). Sin embargo, para mejorar el proceso de extracción se han utilizado métodos convencionales (p. ej. extracción por maceración, Soxhlet e hidrodestilación); así como no convencionales (p. ej. extracción asistida por ultrasonido, microondas, enzimas, etc.), dependientes de diversos factores como la polaridad del solvente, relación solvente-sólido, pH, tiempo, temperatura, entre otros (Azmir *et al.*, 2013; Wijngaard *et al.*, 2012).

Por otra parte, los métodos biotecnológicos como la extracción asistida por fermentación fúngica en medio sólido y en medio líquido, ha sido considerada una potencial estrategia para la obtención de compuestos con actividad antioxidante, a partir de residuos agroindustriales (Martínez-Ávila *et al.*, 2013). La fermentación en medio sólido (FMS) es un proceso en el que el crecimiento del microorganismo se da en un sustrato sólido húmedo en ausencia o casi ausencia de líquido que fluye libremente, mientras que, en la fermentación en medio líquido (FML) el microorganismo es cultivado en medio líquido que contiene nutrientes esenciales. En ambos tipos de fermentación se producen enzimas extracelulares, que simultáneamente son utilizadas para la liberación de los compuestos bioactivos del sustrato (Rosales *et al.*, 2018; Dey *et al.*, 2016).

Asimismo, la recuperación de estos compuestos puede ser dependiente del tipo (cáscara, semillas, etc.), composición química (contenido de agua) y características físicas el sustrato como la porosidad, diámetro de partícula, etc. (Ogidi *et al.*, 2020; Rosales *et al.*, 2018; Dey *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha reportado que la FML ofrece potencial ventaja sobre la FMS, debido a que en este proceso el inóculo puede ser distribuido uniformemente en el sustrato, y el tiempo, así como la velocidad de obtención de compuestos son reducidos (Dey *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2015).

Basados en lo anterior, en un estudio previo se reportó la actividad lignocelulítica del hongo *Pleurotus pulmonarius* sobre mezclas de residuos agroindustriales, en medio líquido (Masaphy y

Levanon, 1992). Mientras que, en un trabajo reciente se demostró el potencial uso de *P. pulmonarius* para recuperar compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas a partir de residuos agroindustriales (Ogidi *et al.*, 2020). Por lo que, la fermentación fúngica utilizando *P. pulmonarius* puede ser una estrategia para la obtención de ingredientes antioxidantes y antimicrobianos a partir de residuos agroindustriales (Ogidi *et al.*, 2020; Rosales *et al.*, 2018).

## 2.6. Propiedad Antioxidante y Antimicrobiana de Extractos Obtenidos de Residuos de Café

Un antioxidante puede definirse como "cualquier sustancia que, en concentraciones bajas, retrasa o inhibe la oxidación de un sustrato oxidable" (Berker *et al.*, 2010). La actividad antioxidante de los residuos de café ha sido asociada a la presencia de compuestos formados por las reacciones de Maillard durante el proceso de tostado, así como a la presencia de compuestos fenólicos presentes en la fracción soluble de la fibra dietaria (Murthy y Naidu, 2012b). Por lo que, la recuperación de los compuestos fenólicos a partir de estos residuos, puede ser una alternativa para la obtención de antioxidantes naturales con posterior uso como aditivos alimentarios (Murthy y Naidu, 2012b; Mussato *et al.*, 2011).

En este contexto, existen diferentes métodos que son utilizados para medir la actividad antioxidante de los componentes recuperados de una fuente vegetal, los cuales se basan en su habilidad para atrapar o inhibir radicales y en el poder que tienen para reducir iones metálicos (Berker *et al.*, 2010; Molyneux, 2004). La molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>\*</sup>) se caracteriza por ser un radical libre estable, cuya deslocalización del electrón sobrante en la molécula da lugar al color violeta intenso y a una banda de absorción en solución de etanol a 520 nm. Cuando el radical se mezcla con un antioxidante (donador de átomo de hidrógeno), da lugar a la forma reducida con pérdida de color violeta a amarillo (Molyneux, 2004). Además, el radical catión del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>\*+</sup>), el cual es formado por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio (estable a pH ácido), al ser mezclado con un antioxidante (donador de electrones) da lugar a la forma reducida con cambio de color medible a 734 nm (Re *et al.*, 1999). Mientras que, en los ensayos de poder reductor implica la reducción de iones férricos (Fe<sup>+3</sup>) a

ferrosos ( $\text{Fe}^{+2}$ ) (Berker *et al.*, 2010).

En el **Cuadro 1**, se reporta la propiedad antioxidante (actividad antirradical DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> y HO<sup>•</sup>, así como poder reductor) de extractos obtenidos de diferentes residuos de café (cáscara, pulpa, cascarilla y bagazo). Estos resultados demostraron que el tipo de residuos, método (extracción asistida por maceración, Soxhlet, ultrasonido y fermentación fúngica) y las condiciones de extracción (solvente y temperatura), influyen en la propiedad antioxidante del extracto obtenido. Sin embargo, son limitados los estudios sobre la recuperación de compuestos antioxidantes a partir de residuos de la industria de café (cascarilla y bagazo), utilizando el método de extracción asistida por fermentación fúngica, en específico fermentación en medio líquido.

**Cuadro 1.** Actividad antioxidante de extractos obtenidos de residuos de café.

<b>Residuo</b>	<b>Condiciones de extracción</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencias</b>
Bagazo	Método: maceración y ultrasonido Solvente: metanol (80%) Secado: no se utilizó	El extracto mostró inhibición del radical DPPH <sup>•</sup> y poder reductor (ultrasonido > maceración).	Okur <i>et al.</i> , 2021
Pulpa	Método: maceración Solvente: agua Secado: no se utilizó	El extracto acuoso mostró poder reductor (*)	Ameca <i>et al.</i> , 2018
Bagazo	Método: maceración y ultrasonido Solvente: agua Secado: al vacío	El extracto mostró inhibición del radical DPPH <sup>•</sup> (maceración = ultrasonido) El extracto acuoso mostró poder reductor (maceración = ultrasonido)	Ben-Romdhane <i>et al.</i> , 2017
Pulpa	Método: maceración Solvente: agua Secado: liofilización o no	El extracto mostró inhibición del radical DPPH <sup>•</sup> y ABTS <sup>•+</sup> (liofilizado > no liofilizado)	Duangjai <i>et al.</i> , 2016
Cascarilla	Método: no especifica Solvente: agua Secado: no especifica	El extracto mostró poder reductor	Bresciani <i>et al.</i> , 2014
Pulpa, cáscara, cascarilla y bagazo	Método: Soxhlet Solvente: isopropanol-agua (6:4) Secado: concentración a vacío	El extracto mostró inhibición del radical DPPH <sup>•</sup> (cascarilla = bagazo > cáscara > pulpa) El extracto mostró inhibición de radicales HO <sup>•</sup> (bagazo > cascarilla > cáscara > pulpa)	Murthy y Naidu, 2012b
Cascarilla y bagazo	Método: fermentación en medio sólido ( <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> sp. y <i>Mucor</i> sp.)	Se demostró la liberación de compuestos fenólicos después del proceso de fermentación	Machado <i>et al.</i> , 2012

	Solvente: no especifica Secado: no se utilizó		
Pulpa y cáscara	Método: fermentación en medio sólido ( <i>Penicillium purpurogenum</i> ) Solvente: acetona (80%) Secado: no se utilizó	El extracto fermentado mostró inhibición del radical DPPH' (cáscara > pulpa > estándar-quercetina)	Palomino-García <i>et al.</i> , 2015

En relación a los compuestos antimicrobianos estos se caracterizan por ejercer una acción letal para las bacterias (bactericida) o inhiben transitoriamente el crecimiento de estas (bacteriostático), y dependiendo de su estructura química pueden ejercer un mecanismo de acción entre los que se puede mencionar a los inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, alteradores de la membrana citoplásmica, inhibidores de la síntesis proteica, alteradores del metabolismo, entre otros (Calvo y Martínez, 2009). La actividad antimicrobiana de los residuos de café ha sido asociada a la presencia de alcaloides y compuestos fenólicos (Nzekoue *et al.*, 2020). Asimismo, en los últimos años se ha incrementado el interés por investigar y desarrollar antimicrobianos de origen natural, por lo que, se ha puesto mayor atención en los métodos de evaluación para determinar esta actividad, entre ellos la difusión en disco, la difusión en pozo y la dilución en agar o caldo (Balouri *et al.*, 2016). En el **Cuadro 2**, se reporta la propiedad antimicrobiana de harinas y extractos obtenidos de diferentes residuos de café (pulpa, cascarilla y bagazo). Estos resultados demostraron que el tipo de residuos, método (extracción asistida por percolación o maceración) y las condiciones de extracción (solvente) influyen en la propiedad antimicrobiana del extracto obtenido, siendo el efecto principal frente a bacterias Gram-positivas que Gram-negativas. No obstante, son limitados los estudios enfocados a la recuperación de compuestos antimicrobianos a partir de residuos de la industria de café, utilizando el método de extracción asistida por fermentación fúngica, en específico la FML.

**Cuadro 2.** Actividad antimicrobiana de extractos obtenidos de residuos de café.

Residuo	Condiciones de extracción	Resultados	Referencias
Bagazo	Método: percolación Solvente: agua y etanol Secado: liofilización	Los extractos (acuoso > etanólico) presentaron actividad antimicrobiana ( <i>Staphylococcus aureus</i> >	Díaz-Hernández <i>et al.</i> , 2022

		<i>Escherichia coli</i> )	
Pulpa	Método: maceración Solvente: agua Secado: liofilización	El extracto presentó actividad antimicrobiana ( <i>S. aureus</i> > <i>E. coli</i> )	Khochapong <i>et al.</i> , 2021
Bagazo	Método: Soxhlet Solvente: etanol (75%) Secado: concentración a vacío	El extracto mostró actividad antimicrobiana ( <i>Bacillus subtilis</i> > <i>E. coli</i> )	Bouhlal <i>et al.</i> , 2020
Cáscara	Método: maceración Solvente: etanol (95%) Secado: concentración a vacío	El extracto presentó actividad antimicrobiana ( <i>S. aureus</i> > <i>Pseudomonas aeruginosa</i> > <i>E. coli</i> )	Al-Yousef y Amina, 2018
Bagazo	Método: maceración Solvente: agua Secado: liofilización	El extracto no presentó actividad frente a microorganismos patógenos ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> y <i>E. coli</i> )	Sant'Anna <i>et al.</i> , 2017
Pulpa	Método: maceración Solvente: agua Secado: liofilización o no	El extracto mostró actividad antimicrobiana ( <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermis</i> > <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> )	Duangjai <i>et al.</i> , 2016
Cascarilla y Bagazo	Método: maceración Solvente: agua Secado: liofilización	Los extractos presentaron inhibición bacteriana ( <i>S. aureus</i> > <i>E. coli</i> )	Jiménez-Zamora <i>et al.</i> , 2015

## 2.7. Residuos de Café como Fuente de Aditivos para Carne y Productos Cárnicos

Los aditivos alimentarios pueden ser definidos como "cualquier sustancia que, independientemente de su valor nutrimental, se agrega intencionalmente a un alimento durante su elaboración en cantidades controladas con fines tecnológicos". Por ejemplo, aportar o intensificar características organolépticas (aroma, color o sabor) y para mejorar estabilidad o para su conservación (NOM, 2002). En relación con la conservación de alimentos, se ha demostrado que la oxidación de lípidos y proteínas, así como la contaminación por microorganismos deteriorativos o patógenos son algunos de los principales factores que afectan la pérdida de calidad en carne y productos cárnicos, crudos y/o cocidos. En consecuencia, estos factores favorecen la formación de compuestos que además de ser tóxicos, afectan el valor nutritivo y los atributos sensoriales, reduciendo la aceptabilidad del

producto (Ramírez-Rojo *et al.*, 2018; Valenzuela y Pérez, 2016; Falowo *et al.*, 2014).

Por lo anterior, en carne y productos cárnicos (frescos y cocinados) son ampliamente utilizados aditivos con fines de conservación, como es el uso de aditivos sintéticos (p. ej. BHA, BHT, galato de propilo, otros). No obstante, el uso no controlado de estos conservadores puede tener un efecto negativo en la salud del consumidor, por esta razón, se han realizado esfuerzos para la recuperación de compuestos antioxidantes y antimicrobianos de diversas fuentes naturales, incluidos los subproductos agroindustriales (Ramírez-Rojo *et al.*, 2018; Falowo *et al.*, 2014; NOM, 2002; Pfalzgraf *et al.*, 1995).

En este contexto, en un trabajo de investigación se evaluó el efecto de la adición del extracto acuoso de granos de café sobre la formación de productos primarios de la oxidación de lípidos en alimentos. Los resultados de este trabajo demostraron un efecto inhibitorio sobre la formación de dienos conjugados, lo cual fue asociado a la presencia de compuestos fenólicos en el extracto, incluyendo al ácido ferúlico y ésteres del ácido cafeoilquínico (Schwarz *et al.*, 2001). Además, en otro trabajo se evaluó el efecto de la adición del extracto acuoso de granos de café (50 ppm) sobre la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cerdo cocidas, durante su almacenamiento (4 °C, durante 6 días). Los resultados de este trabajo demostraron la capacidad del extracto para reducir los valores de oxidación de lípidos-TBARS (Nissen *et al.*, 2004).

Por otra parte, en otro estudio se evaluó el efecto de la adición de 0.1% de granos de café con diferente grado de tostado (ligero, medio y negro), sobre la estabilidad oxidativa de carne molida de res durante su almacenamiento (4 °C, durante 10 días). Los resultados de este estudio demostraron la capacidad del café para reducir en más del 50% los valores de TBARS y evitar la pérdida de color rojo en el producto cárnico, independientemente del grado de tostado (Lin *et al.*, 2015). Adicionalmente, en el **Cuadro 3** se reportan algunos de los estudios sobre el uso de los residuos de café como posible aditivo antioxidante para carne y productos cárnicos. Los resultados descritos en este cuadro muestran que los residuos de café (bagazo, cáscara y cascarilla) poseen potencial para ser utilizados como ingredientes alimentarios, debido a que tuvieron un efecto conservador al reducir los valores de oxidación de lípidos y de formación de metamioglobina, y consecuentemente incrementar la estabilidad del color rojo característico de la carne fresca. No obstante, son limitados los estudios sobre el uso de estos residuos en carne y productos cárnicos con el fin de reducir el crecimiento microbiano o la presencia de microorganismos patógenos durante condiciones de almacenamiento. También, son limitados los estudios sobre el uso de extractos

obtenidos a partir de residuos del procesamiento del café como pulpa, cáscara y cascarilla (fermentados o no), así como su efecto sobre la estabilidad oxidativa y crecimiento microbiano de productos cárnicos.

**Cuadro 3.** Uso de los residuos de café como conservador para carne y productos cárnicos.

<b>Fuente</b>	<b>Condiciones de extracción</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencias</b>
Cascarilla	Método: no se utilizó Solvente: no se utilizó Secado: liofilización	Las salchichas formuladas con cascarilla de café en combinación con la pulpa de manzana presentaron inhibición de oxidación de lípidos (TBARS)	Thangavelu <i>et al.</i> , 2022
Cáscara	Método: maceración Solvente: etanol (90%) Secado: no se utilizó	La incorporación del extracto (200 ppm) en las hamburguesas de pollo redujo la oxidación de lípidos (TBARS) y proteínas (Carbonilos) al igual que el antioxidante sintético y redujo la pérdida del color	de Farias Marques <i>et al.</i> , 2022
Cascarilla	Método: no se utilizó Solvente: no se utilizó Secado: no se indica proceso	La adición de la harina (1.5 y 3%) redujo la pérdida de peso por cocción en hamburguesas de pollo, así como los valores de oxidación de lípidos (TBARS)	Martuscelli <i>et al.</i> , 2021
Bagazo	Método: no se utilizó Solvente: no se utilizó Secado: liofilización	La adición de 0.1% en polvo en carne molida de cerdo, redujo la oxidación de lípidos (TBARS) y la formación de metamioglobina (MetMb)	Hashinomoto <i>et al.</i> , 2019
Bagazo	Método: ultrasonido Solvente: agua Secado: liofilización	El extracto incrementó el color rojo y redujo los valores de TBARS en hamburguesas de cerdo crudas (9 d, 4 °C), durante su almacenamiento (extracto > BHT > control)	Murillo-Hernández <i>et al.</i> , 2019
Bagazo	Método: maceración Solvente: agua y etanol Secado: no se utilizó	El extracto redujo los valores de TBARS (etanol > agua) en carne molida de pollo cruda (12 h, 37 °C) y cocida (5 d, 4 °C), durante su almacenamiento	Kim <i>et al.</i> , 2016
Bagazo	Método: no se utilizó Solvente: no se utilizó Secado: liofilización	La adición de 0.1% en polvo en carne molida de cerdo (cocida y congelada), redujo los valores de TBARS y la pérdida del color rojo	Jully <i>et al.</i> , 2016

### **3. HIPÓTESIS**

La incorporación de cascarilla de café fermentada con *Pleurotus pulmonarius* incrementa la estabilidad oxidativa y microbiológica en carne de cerdo molida.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Determinar el efecto del extracto acuoso obtenido de la cascarilla de café fermentada en medio líquido con *Pleurotus pulmonarius* sobre la estabilidad oxidativa y microbiológica de carne de cerdo molida.

### 4.2. Objetivos Específicos

Obtener extractos acuosos de cascarilla de café mediante extracción asistida por maceración (EAM) y fermentación en medio líquido con *Pleurotus pulmonarius* (FML).

Determinar el contenido de compuestos bioactivos (carbohidratos totales, compuestos fenólicos, flavonoides y ácido cafeoilquínico) del extracto de cascarilla de café obtenido por EAM y FML.

Determinar la actividad antirradical (DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>) y poder reductor del extracto de cascarilla de café obtenido por EAM y FML.

Determinar la actividad antimicrobiana del extracto de cascarilla de café obtenido por EAM y FML sobre microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*).

Evaluar el efecto de la inclusión del extracto de cascarilla de café obtenido por EAM y FML, sobre la estabilidad oxidativa (pH, color, formación de metamioglobina y oxidación de lípidos) en homogenizados de carne de cerdo.

Evaluar el efecto de la inclusión de extracto de cascarilla de café obtenido por EAM y FML, sobre la cuenta total de mesófilos y psicrófilos aerobios en homogenizados de carne de cerdo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Residuo Agroindustrial

La cascarilla de café fue proporcionada por un proveedor comercial local (CAFFENIO®, Hermosillo, Sonora, México), la cual fue secada a 60 °C (horno de secado Yamato DX402, Tokio, Japón) hasta alcanzar un contenido de humedad del 10%, y esterilizada a 121 °C durante 20 min (autoclave Yamato SM300, Tokio, Japón), para ser utilizados inmediatamente después de este proceso.

### 5.2. Obtención de los Extractos Acuosa

La cepa de *Pleurotus pulmonarius* (IE-115) fue obtenida de la colección del Laboratorio de Biotecnología de Hongos y Plantas del CIAD, A.C. La cepa se cultivó en placas Petri con agar papa dextrosa (PDA) a 25 °C durante 8 días (incubadora Yamato IC602, Tokio, Japón), hasta que el micelio cubrió completamente la superficie, la cual se almacenó en condiciones de refrigeración (4 °C) para su preservación. El medio de cultivo fue preparado con los siguientes ingredientes (g/L): glucosa (20), extracto de levadura (5.0), ácido ascórbico (0.05),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.0), y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5). El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.4 con solución de NaOH 1 N o HCl 1 N, el cual antes de ser utilizado fue sometido a un proceso de esterilización. La EAM se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL del medio de cultivo y el residuo de café a concentraciones de 0, 1.5 y 3.0% (EAM-0%, EAM-1.5% y EAM-3.0%, respectivamente) con agitación durante 24 h/150 rpm/29 °C, en oscuridad (incubadora rotaria con agitación MaxQ™ 5000, Fisher Scientific, Nepean, Canadá). Posteriormente, el medio de cultivo se filtró (papel filtro Whatman no. 4) y secó (liofilizador Yamato DC401, Tokio, Japón), durante dos días.

La fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL del medio de cultivo y el residuo de café en concentraciones de 0, 1.5 y 3.0% (FML-0%, FML-1.5% y FML-

3.0%, respectivamente). Los matraces se incubaron durante 10 días/150 rpm/29 °C, en oscuridad. Al finalizar el proceso de fermentación, el medio de cultivo se homogenizó durante 30 seg/10,000 rpm/5 °C (Ultraturrax T25, IKA®, Staufen, Alemania), se filtró (papel filtro Whatman no. 4) y secó por liofilización, durante dos días.

Los extractos acuosos obtenidos se almacenaron en frascos de polipropileno a -20 °C en oscuridad, hasta su análisis (Liu *et al.*, 2018).

### 5.3. Contenido de Metabolitos de los Extracto Acuoso

La composición química del extracto se evaluó determinando el contenido de carbohidratos, fenoles y flavonoides totales (CCT, CFT, CFvT, respectivamente), así como de ácido cafeoilquínico (CAC), como se describe a continuación:

El CCT se determinó por el método del fenol-ácido sulfúrico (Albalasmeh *et al.*, 2013). El extracto (50 µL, 5 mg/mL) se agregó una microplaca de 96-Pozos y se homogenizó con 25 µL de solución acuosa de fenol (5%, v/v) y 125 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 min, en oscuridad. Posteriormente, la absorbancia se midió a 490 nm en un espectrofotómetro (Multiskan FC UV-Vis, Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de glucosa por g de extracto seco (mg EG/g).

El CFT se determinó por el método del Folin-Ciocalteu (Ainsworth y Gillespie, 2007). El extracto (20 µL, 5 mg/mL) se homogenizó con 160 µL de agua destilada, 60 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%, p/v) y 40 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (2 M). La mezcla de reacción se incubó (25 °C) durante 1 h, en la oscuridad. Posteriormente, la absorbancia se midió a 750 nm, y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g (mg EAG/g).

El CFvT se determinó por el método de formación del complejo cloruro de aluminio (Popova *et al.*, 2004). El extracto (20 µL, 5 mg/mL) se homogenizó con 260 µL de metanol y 10 µL de AlCl<sub>3</sub> (10%, p/v). La mezcla de reacción se incubó (25 °C) durante 30 min, en oscuridad. Posteriormente, la absorbancia se midió a 412 nm, y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de quercetina por g (mg EQc/g).

El CAC se determinó como se reporta previamente por Griffiths *et al.* (1992). El extracto (100  $\mu\text{L}$ , 5 mg/mL) se homogenizó con 200  $\mu\text{L}$  de urea (0.17 M), 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial (0.1 M) y 500  $\mu\text{L}$  de NaOH (0.5 M). La mezcla de reacción se centrifugó durante 10 min/2,250 $\times$  g/4  $^{\circ}\text{C}$  (Sorvall ST18R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Posteriormente, la absorbancia se midió a 510 nm, y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido cafeoilquínico por g (mg EAC/g).

#### 5.4. Actividad Antioxidante de los Extractos

La actividad antioxidante del extracto fue evaluada mediante la capacidad para secuestrar a los radicales libres y radicales cationes DPPH $^{\bullet}$  y ABTS $^{+\bullet}$ , así como poder reductor (PR y FRAP), como a continuación se describe:

La actividad secuestradora de radicales libres se determinó mediante el método DPPH $^{\bullet}$  (Molyneux, 2004). El extracto (100  $\mu\text{L}$ , 5 mg/mL) se homogenizó con 100  $\mu\text{L}$  de solución DPPH $^{\bullet}$  (300  $\mu\text{M}$ ) y se incubó (25  $^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 min, en la oscuridad. La absorbancia se midió a 517 nm, utilizando butilhidroxitolueno (BHT) a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como estándar. Los resultados fueron expresados en porcentaje, calculándose de la siguiente manera: DPPH $^{\bullet}$  (%) = (Abs A – Abs B/Abs A)  $\times$  100, donde Abs A es la absorbancia del control (t = 0) y Abs B es la absorbancia del antioxidante (t = 30 min).

La actividad secuestradora del radical catión se determinó mediante el método ABTS $^{+\bullet}$  (Re *et al.*, 1999). Previo al análisis, partes iguales de solución etanólica del radical ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (2.45 M) se homogenizaron durante 1 min/10,000 rpm/en la oscuridad, y la solución resultante se almacenó (4  $^{\circ}\text{C}$ ) durante 16 h, en la oscuridad. El radical formado se ajustó a una absorbancia de 0.8 con etanol, se mezcló con el extracto (5 mg/mL) en una relación 99:1, y se incubó durante 10 min a 25  $^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente medir la absorbancia a 734 nm. El ácido ascórbico (70  $\mu\text{M}$ ) se utilizó como estándar. Los resultados fueron expresados en porcentaje, calculándose de la siguiente manera: ABTS $^{+\bullet}$  (%) = (Abs A – Abs B/Abs A)  $\times$  100, donde Abs A es la absorbancia del control (t = 0), y Abs B es la absorbancia del antioxidante (t = 10 min).

El PR se determinó mediante el método del ferricianuro/azul Prusia (Berker *et al.*, 2010). El

extracto (100  $\mu\text{L}$ , 5 mg/mL) se homogenizó con 300  $\mu\text{L}$  de bufer de fosfatos (0.2 M, pH 6.6) y 300  $\mu\text{L}$  de ferrocianuro de potasio (1%, p/v). La solución resultante se incubó (50 °C durante 20 min, en la oscuridad), posteriormente, se homogenizó con 300  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (10%, p/v) y centrifugó (4,200 $\times$  g/ 10 min/ 4 °C). La mezcla de reacción (100  $\mu\text{L}$ ) se mezcló con 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 250  $\mu\text{L}$  de cloruro férrico (0.1%, p/v). La absorbancia se midió a 700 nm, expresándose los resultados como incremento en la absorbancia a la misma longitud de onda.

El poder antioxidante reductor férrico se determinó por el método de FRAP (Berker *et al.*, 2010). El extracto (20  $\mu\text{L}$ , 5 mg/mL) se homogenizó con 150  $\mu\text{L}$  de solución FRAP [10:1:1, buffer de acetato de sodio 300 mM en ácido acético glacial a pH 3.6 y 4,4,6- tripiridil-S-triazina (TPTZ) en HCl 40 nM y FeCl<sub>3</sub> 20 mM]. La mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante 8 min, en la oscuridad. La absorbancia se midió a 595 nm, y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de Fe<sup>2+</sup> por g de extracto seco (mg Fe<sup>2+</sup>/g).

### 5.5. Actividad Antimicrobiana de los Extractos

La actividad antibacteriana de cada extracto se evaluó según el método de microdilución en caldo (Jorgensen y Turdnige, 2015), con ligeras modificaciones, para la cual se utilizaron cuatro cepas de bacterias estándar obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyéndose dos Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213B y *Listeria monocytogenes* ATCC 33090) y dos Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Las cepas se reactivaron en caldo nutritivo líquido (BHI, infusión de cerebro corazón) a 37 °C durante 24 a 48 h. Posteriormente, la suspensión de las cepas se diluyó con solución salina hasta alcanzar la turbidez de 0.5 estándar de McFarland, sulfato de bario - BaSO<sub>4</sub> (aprox. 1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). La precisión del método se verificó utilizando un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm, es decir, para el estándar de McFarland de 0.5, la absorbancia a 620 nm debe pasar de 0.08 a 0.13. Luego, las cepas diluidas (100  $\mu\text{L}$ ) se transfirieron a cada pocillo de una microplaca plana de 96 pozos y se homogenizaron con una alícuota de cada extracto (20  $\mu\text{L}$ , 5 mg/mL). Como control positivo para la inhibición del crecimiento bacteriano se utilizó cloranfenicol (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mientras que como blanco de crecimiento bacteriano o control negativo se usó BHI. Las placas se

incubaron a 37 °C durante 24 h, y los resultados fueron expresados como absorbancia a 620 nm (OD, densidad óptica).

### 5.6. Actividad Antioxidante de los Extractos en Homogenizados de Carne de Cerdo

Para determinar la estabilidad oxidativa en un producto cárnico. La carne de cerdo molida (*M. Semimembranosus*) se obtuvo con un proveedor local, la cual se mezcló con sal (1.5%, p/p) y grasa (10% en la formulación final, p/p). A partir de esta mezcla se obtuvieron extractos cárnicos homogenizando (4,500 rpm/1 min/5 °C) con agua destilada en una proporción 1:10. Posteriormente, 10 mL del homogenizado cárnico se mezclaron con 1 mL de agua destilada (control), así como 1 mL de una solución a 200 ppm de BHT, EAM-0%, EAM-1.5%, EAM-3.0%, FML-0%, FML-1.5% y FML-3.0%, respectivamente. Las muestras fueron pro-oxidadas adicionando 0, 0.5 y 1% de ferrocianuro de potasio (20 µL), respectivamente, y sometidas a análisis de pH, color, formación de metamioglobina (MetMb) y oxidación de lípidos (TBARS), como a continuación se describe:

El pH del homogenizado cárnico se midió con un potenciómetro (pH211, Hanna, Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA) equipado con un electrodo de vidrio y compensación automática de temperatura (AOAC, 2005).

El color del homogenizado cárnico se determinó con un espectrofotómetro (C508d, Konica Minolta Inc., Tokio, Japón). Los parámetros registrados fueron luminosidad ( $L^*$ ), índice de rojo ( $a^*$ ), índice de amarillo ( $b^*$ ), cromaticidad (C) y hue (h). Para llevar a cabo la medición, los homogenizados cárnicos (50 mL) fueron colocados en una celda de cuarzo y las lecturas se realizaron sobre la superficie de la celda (Robertson *et al.*, 1977).

La MetMb del homogenizado cárnico se determinó espectrofotométricamente midiendo la reflectancia a 525 y 572 nm (Stewart *et al.*, 1965). El valor máximo del cociente K/S525 y K/S572 en las muestras sin oxidar se fijó como 0% MetMb, mientras que el valor de 100% MetMb se obtuvo después de oxidar el homogenizado cárnico con ferricianuro de potasio (1%, p/v) durante 2 h.

La oxidación de lípidos se determinó mediante el método TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) (Pfalzgraf *et al.*, 1995), con ligeras modificaciones. Los homogenizados cárnicos

(0.5 mL) se mezclaron con 1 mL de TCA (10%, p/v). La solución resultante se filtró (Whatman no. 1) y 1 mL del filtrado se mezcló con 1 mL de TBA (0.02 M). La mezcla de reacción se incubó en baño de agua (97 °C durante 20 min), y se enfrió a 4 °C. La absorbancia se midió a 531 nm. Los resultados fueron expresados como mg de malondialdehído por kg de carne (mg MDA/kg)

### 5.7. Actividad Antimicrobiana de los Extractos en Homogenizados de Carne de Cerdo

El crecimiento de mesófilos y psicrófilos aerobios se determinó de acuerdo con lo establecido en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-110-SSA1, 1994). El homogenizado cárnico se mezcló con agua peptonada al 0.1% (p/v) en una proporción 1:10, durante 1 min, para posteriormente preparar diluciones seriadas con solución salina al 0.1% (p/v), y 1 mL de cada dilución se transfirió en una placa con agar PCA estándar. Las placas se incubaron a 32 °C por 48 h y 7 °C por 10 d, para el crecimiento de microorganismos mesófilos y psicrófilos, respectivamente. Los recuentos se expresaron como log<sub>10</sub> de unidades formadoras de colonias (UFC)/g.

### 5.8. Análisis estadístico

En esta investigación todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado de al menos dos réplicas experimentales (n = 6), cuyos datos obtenidos fueron expresados como promedio ± desviación estándar. Los resultados de composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, considerando como efectos principales el método de extracción (EAM y FML) y el nivel de adición del residuo (0, 1.5 y 3.0%). Mientras que, las pruebas de actividad antioxidante y antimicrobiana del homogenizado de carne de cerdo fueron sometidas a un ANDEVA de dos vías, considerando al tratamiento (Control, BHT, EAM-0%, EAM-1.5%, EAM-3.0%, FML-0%, FML-1.5% y FML-3.0%) y al nivel de pro-oxidación (0, 0.5 y 1.0%) como efectos principales. Las diferencias entre los tratamientos se analizaron mediante una prueba de comparación de medias (Tukey-Kramer), cuando se encontró un efecto significativo ( $P < 0.05$ ). Estos análisis fueron llevados a cabo utilizando el paquete estadístico NCSS versión 21.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Contenido de Metabolitos de los Extractos Obtenidos por EAM y FML

La cascarilla de café es considerada una importante fuente a partir de la que pueden recuperarse diversos metabolitos primarios como los carbohidratos solubles e insolubles, ácidos grasos y aminoácidos, así como metabolitos secundarios entre los que se incluye a los compuestos fenólicos (Campos-Vega *et al.* 2015; Bresciani *et al.*, 2014). Sin embargo, como se mencionó previamente la presencia o contenido de estos metabolitos dependerá del método de extracción utilizado para su extracción (Azmir *et al.*, 2013). Los resultados derivados del análisis del contenido de metabolitos del extracto acuoso de cascarilla de café por EAM y FML (**Cuadro 4**), indicaron que los valores fueron afectados significativamente por el método de extracción y nivel de residuo utilizado ( $P < 0.001$ ). El mayor contenido de carbohidratos lo presentó el extracto EAM-0% ( $> 800$  mg EG/g), y esta determinación depende de la absorbancia UV de los derivados de furfural producidos por reacción con ácido sulfúrico concentrado (Albalasmeh *et al.*, 2013). Mientras que el extracto FML-3.0% mostró el mayor contenido total de fenoles, flavonoides y ácido cafeoilquínico ( $> 6$  mg EAG/g,  $> 1.2$  mg EQC/g y  $> 70$  mg EAC/g, respectivamente). El contenido de ácidos fenólicos se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino desde X-OH a los complejos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico (Ainsworth y Gillespie, 2007); mientras que, el método para determinar el contenido de flavonoides se basa en la formación de un complejo entre el ion aluminio ( $AlCl_3$ ) y los grupos carbonilo e hidroxilo de los compuestos fenólicos (Popova *et al.*, 2014); y en la determinación del contenido de ácido cafeoilquínico, el método se basa en la interacción del ácido nitroso con orto-dihidroxifenoles (grupo catecol) (Griffiths *et al.*, 1992).

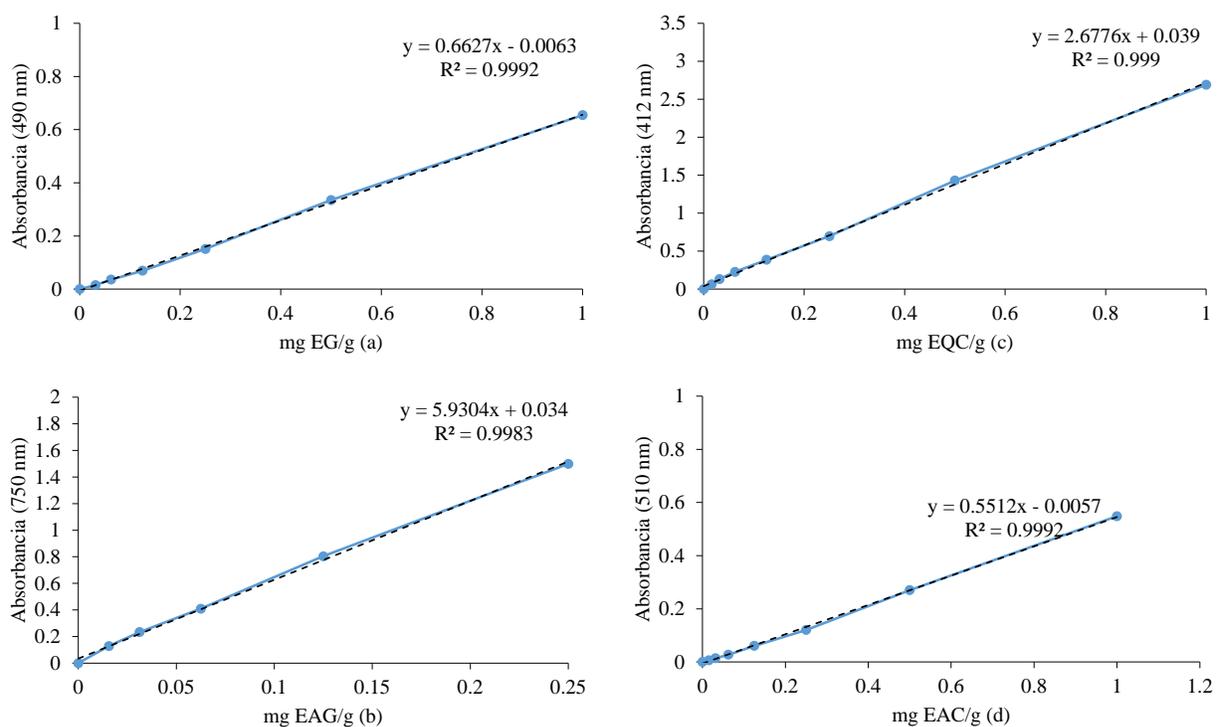
**Cuadro 4.** Contenido de metabolitos del extracto acuoso de cascarilla de café obtenido por EAM y FML.

Método	Carbohidratos (mg EG/g)	Fenoles (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQC/g)	Ác. Cafeoilquínico (mg EAC/g)
EAM-0%	$837.76 \pm 17.74^c$	$1.91 \pm 0.05^a$	$0.04 \pm 0.01^a$	$9.80 \pm 0.32^a$
EAM-1.5%	$773.58 \pm 15.28^b$	$2.24 \pm 0.18^b$	$0.98 \pm 0.04^c$	$22.26 \pm 0.60^b$

EAM-3.0%	745.15 ± 24.76 <sup>b</sup>	3.45 ± 0.27 <sup>c</sup>	1.17 ± 0.05 <sup>e</sup>	22.16 ± 0.38 <sup>b</sup>
FML-0%	746.84 ± 25.57 <sup>b</sup>	5.32 ± 0.16 <sup>d</sup>	0.84 ± 0.03 <sup>b</sup>	50.39 ± 0.93 <sup>c</sup>
FML-1.5%	667.26 ± 19.98 <sup>a</sup>	5.73 ± 0.20 <sup>e</sup>	1.05 ± 0.03 <sup>d</sup>	50.37 ± 0.84 <sup>c</sup>
FML-3.0%	651.48 ± 13.29 <sup>a</sup>	6.42 ± 0.10 <sup>f</sup>	1.29 ± 0.01 <sup>f</sup>	76.11 ± 0.10 <sup>d</sup>

Los datos son expresados como media ± desviación estándar (n = 6). EAM, extracción asistida por maceración; FML, fermentación en medio líquido; EG, equivalentes de glucosa; EAG, equivalentes de ácido gálico; EQC; equivalentes de quercetina; EAC; equivalentes de ácido clorogénico. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

En la **Figura 4** se muestran las curvas de calibración para la cuantificación de metabolitos en este estudio.



**Figura 4.** Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de metabolitos.

En acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se ha reportado una reducción en el contenido de metabolitos primarios (contenido de carbohidratos) durante la producción de biomasa de *Pleurotus sajor-caju* durante FML, lo cual se asocia a que la glucosa es la principal fuente de carbono para el crecimiento fúngico (Confortin *et al.*, 2008). Respecto a los metabolitos

secundarios, en un estudio previo (Machado *et al.*, 2012), se evaluó la liberación de compuestos fenólicos de residuos de la industria del café (bagazo y cascarilla de café) por FMS utilizando diferentes cepas de hongos, incluyendo *Aspergillus niger* AA20, *A. niger* GH1, *A. niger* PSH, *A. ustus* PSS, *Mucor* sp. 3P, *Neurospora crassa* y *Penicillium purpurogenum* GH2 (30 °C/6 días). Los resultados mostraron que el extracto acuoso de bagazo de café fermentado con *N. crassa* y *P. purpurogenum* GH2, así como los extractos acuosos de cascarilla de café fermentada con *A. niger* AA20 y *P. purpurogenum* GH2 mostraron el mayor contenido de compuestos fenólicos.

En otro estudio (Palomino-García *et al.*, 2015), se evaluó el contenido de compuestos fenólicos del extracto acetónico (80%) obtenido después de fermentar residuos de la industria del café (cáscara y pulpa) por FMS con micelio de *Penicillium purpurogenum* durante 5 días. De acuerdo con los resultados, el mayor contenido de fenoles totales fue presentado en la cáscara y pulpa de café bajo las siguientes condiciones: pH de 4 a 6, contenido de humedad entre el 50 al 70%, y temperatura promedio de 34 °C. No obstante, la cáscara fermentada presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos, incluyendo al ácido cafeico, ácido clorogénico y rutina, en comparación con pulpa fermentada. En base a estos resultados, se consideró al proceso de fermentación como un método de extracción de compuestos bioactivos viable.

Aunque no se reportan estudios en los que se utiliza a la FML para la recuperación de compuestos bioactivos a partir de residuos de la industria del café, se han reportado diversos estudios en los que se utiliza la extracción asistida por FMS y FML con subproductos agroindustriales como sustratos (cáscaras, pulpas y semillas) para la recuperación de compuestos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Vargas-Sánchez *et al.*, 2021).

## 6.2. Actividad Antioxidante de los Extractos Obtenidos por EAM y FML

Los antioxidantes son sustancias que en bajas concentraciones pueden prevenir o reducir la oxidación de macromoléculas, incluyendo proteínas y lípidos, mediante la inhibición de radicales o por quelación de iones metálicos, por lo que, para determinar la eficacia de un antioxidante se requiere del uso de varios métodos (Liu, 2010; Pisoschi y Pop, 2015). El DPPH<sup>•</sup> es un radical estable que se utiliza para evaluar la capacidad de un antioxidante para eliminar radicales, en este

método el átomo de H del grupo OH del compuesto fenólico (X-OH) puede transferirse al radical DPPH<sup>•</sup> para neutralizarlo, es decir, está implícito el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno o HAT (DPPH<sup>•</sup> + X-OH = DPPHH + X-O<sup>•</sup>). Mientras que, al utilizar el radical ABTS<sup>•+</sup> se mide la capacidad de X-OH para transferir electrones (ABTS<sup>•+</sup> + X-OH = ABTS + X-OH<sup>•+</sup>). Por ello, se ha demostrado que ambos métodos miden la actividad antioxidante de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos. Además, el ensayo de ferricianuro/azul de Prusia o la medición de RP, implica la reducción mediante la transferencia de electrones del X-OH al ion férrico (Fe<sup>3+</sup>) para reducirlo a ion ferroso (Fe<sup>2+</sup>), mientras que el ensayo FRAP utiliza ligando tripiridiltriazina-TPTZ (Berker *et al.*, 2010; Molyneux, 2004; Re *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos de las propiedades antioxidantes (actividad antirradical y poder reductor) del extracto acuoso de cascarilla de café obtenido por EAM y FML (**Cuadro 5**), indican que los valores fueron afectados significativamente por el método de extracción y nivel de residuo utilizado ( $P < 0.001$ ). La mayor actividad antioxidante la presentó el antioxidante de origen sintético utilizado como control positivo; no obstante, al comparar los extractos de origen natural la mayor actividad para inhibir radicales DPPH<sup>•</sup> la mostró el extracto EAM-3.0% (>60% de inhibición), mientras que los extractos FML-1.5% y FML-3.0% mostraron la mayor actividad para inhibir radicales ABTS<sup>•+</sup> (aproximadamente 56% de inhibición) y el mayor valor de FRAP (aprox. 0.3 mg Fe<sup>2+</sup>/g). Además, el extracto FML-3.0% exhibió el valor más alto de PR (>0.3 abs).

**Cuadro 5.** Actividad antioxidante del extracto acuoso de cascarilla de café obtenido por EAM y FML.

Método	DPPH <sup>•</sup> (% inhibición)	ABTS <sup>•+</sup> (% inhibición)	PR (Abs 700 nm)	FRAP (mg Fe <sup>2+</sup> /g)
EAM-0%	9.90 ± 1.96 <sup>a</sup>	37.76 ± 1.03 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>
EAM-1.5%	54.14 ± 5.02 <sup>c</sup>	39.84 ± 1.06 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>b</sup>
EAM-3.0%	68.14 ± 1.84 <sup>d</sup>	45.82 ± 2.47 <sup>c</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>c</sup>
FML-0%	11.43 ± 0.87 <sup>a</sup>	42.24 ± 2.63 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>c</sup>
FML-1.5%	11.33 ± 1.04 <sup>a</sup>	55.71 ± 1.58 <sup>d</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>cd</sup>
FML-3.0%	19.69 ± 1.47 <sup>b</sup>	58.90 ± 1.37 <sup>d</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>d</sup>
BHT	73.35 ± 1.96 <sup>c</sup>	67.30 ± 2.96 <sup>e</sup>	1.30 ± 0.04 <sup>e</sup>	1.41 ± 0.09 <sup>e</sup>

Los datos son expresados como media ± desviación estándar (n = 6). EAM, extracción asistida por maceración; FML, fermentación en medio líquido; BHT, butilhidroxitolueno (100 µg/mL); DPPH<sup>•</sup>, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo; ABTS<sup>•+</sup>, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate); PR, poder reductor; FRAP, poder antioxidante reductor férrico. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

En acuerdo con los resultados del presente estudio, se ha reportado la actividad antioxidante del extracto acetónico (80%) obtenido después de fermentar cáscara y pulpa de café por FMS con micelio de *P. purpurogenum* durante 5 días. Los resultados obtenidos indicaron que la cáscara de café fermentada presentó alta actividad antirradical DPPH\* ( $EC_{50} = 27.4$  ppm), en comparación con la pulpa de café ( $EC_{50} = 36.4$  ppm). No obstante, el control positivo (rutina) utilizado mostró la mayor actividad antirradical DPPH\* ( $EC_{50} = 5.7$  ppm) (Palomino-Garcia *et al.*, 2015).

En otro estudio (Ogidi *et al.*, 2020), se evaluó la actividad antioxidante del extracto de diferentes residuos agroindustriales (cáscara de piña, mango, plátano, nuez, cacahuate y coco) obtenidos por FML con micelio de *P. pulmonarius* (26 °C/150 rpm/18 días). Los resultados de este trabajo mostraron un incremento en la actividad antirradical DPPH\* en el extracto de cáscara de piña obtenido por FML (80% de inhibición a 100 µg/mL), al comparar con el extracto obtenido por FML en el que no se utilizó residuo como sustrato o control (aprox. 70% de inhibición). Además, este resultado fue similar al valor del control positivo o BHT. Respecto al poder reductor, los resultados mostraron un incremento en la actividad para reducir iones metálicos en el extracto de cáscara de cacahuate de FML (aprox. 80% de quelación a 100 µg/mL), al comparar con el extracto control de FML (aprox. 70% de quelación); no obstante, el BHT presentó el mayor poder reductor (aprox. 85% de quelación).

Aunque son limitados los estudios en los que se utiliza la FML para la recuperación de extractos con actividad antioxidante a partir de residuos de la industria del café, en recientes estudios se reporta el uso de subproductos agroindustriales (bagazo de prensado de cacahuate y caña de azúcar, salvado de arroz negro, mazorca de maíz, paja de arroz y trigo) para la recuperación de compuestos con propiedades antioxidantes por FMS (Chandra y Arora, 2016; Sath *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2019). También, se reporta el uso de otros residuos agroindustriales (bagazo de caña, cáscara de cacahuate, cáscara de cítricos, mazorca de maíz y pulpa de manzana) para la recuperación de compuestos con actividad antioxidante por FML (Choi *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014; Zhu y Xu, 2013).

### 6.3. Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos por EAM y FML

En los últimos años, al igual que la actividad antioxidante, la actividad antimicrobiana es

considerada otra de las propiedades más evaluadas en los compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales. Por esta razón, se han utilizado diversos métodos para evaluar esta propiedad, entre los que se incluye la citofluorimetría de flujo y la bioluminiscencia, para que se puedan realizar, es necesario disponer de equipos especiales. No obstante, existen otros métodos más sencillos para pruebas de actividad antimicrobiana como son los de difusión en disco, difusión en pozo, dilución en agar o caldo (Balouri *et al.*, 2016; Papuc *et al.*, 2017). Este último método es considerado como la prueba más básica, y cuyo procedimiento consiste en preparar diluciones (concentraciones a probar) en un medio de cultivo líquido (p. ej. Agar BHI) utilizando volúmenes inferiores a 300  $\mu\text{L}$  en una placa de 96 pozos (microplaca). En cada pocillo se coloca cierta cantidad de agar BHI que se inocula con la cepa a probar a una concentración conocida (McFarland 0.5) y un volumen de concentración del antimicrobiano, considerando los respectivos controles negativo (caldo) y positivo o antibiótico comercial (Balouri *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos en la evaluación de las propiedades antimicrobianas del extracto acuoso de cascarilla de café obtenido por EAM y FML frente a bacterias patógenas (**Cuadro 6**), indicaron que los valores fueron afectados significativamente por el método de extracción y nivel de residuo utilizado ( $P < 0.001$ ). De acuerdo con lo que se observa en este cuadro, la mayor actividad para inhibir bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) y Gram-negativas (*E. coli* y *S. typhimurium*) la exhibió el antibiótico utilizado como control positivo; sin embargo, al comparar los extractos de origen natural la mayor actividad la mostraron los extractos EAM-1.5% y EAM-3.0% *S. aureus* y *L. monocytogenes* en comparación con el control negativo ( $P < 0.05$ ). Mientras que, los extractos EAM-1.5%, EAM-3.0%, FML-0%, FML-1.5% y FML-3.0% mostraron la mayor actividad para inhibir a *E. coli* ( $P < 0.05$ ), y, los extractos EAM-3.0%, FML-0%, FML-1.5% y FML-3.0% tuvieron los valores más bajos de inhibición para *S. typhimurium* respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 6.** Actividad antimicrobiana del extracto acuoso de cascarilla de café obtenido por EAM y FML.

Método	D.O. 620 nm			
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
EAM-0%	$0.75 \pm 0.01\text{e}$	$0.76 \pm 0.04\text{d}$	$0.53 \pm 0.03\text{c}$	$0.71 \pm 0.01\text{c}$
EAM-1.5%	$0.61 \pm 0.02\text{b}$	$0.56 \pm 0.04\text{b}$	$0.34 \pm 0.03\text{b}$	$0.71 \pm 0.03\text{c}$
EAM-3.0%	$0.61 \pm 0.02\text{b}$	$0.49 \pm 0.04\text{b}$	$0.31 \pm 0.03\text{b}$	$0.65 \pm 0.02\text{b}$

FML-0%	0.72 ± 0.02d	0.60 ± 0.03c	0.36 ± 0.03b	0.67 ± 0.01b
FML-1.5%	0.70 ± 0.04d	0.63 ± 0.03c	0.35 ± 0.03b	0.68 ± 0.03b
FML-3.0%	0.65 ± 0.01c	0.65 ± 0.02c	0.30 ± 0.02b	0.66 ± 0.02b
CN (-)	0.78 ± 0.02e	0.84 ± 0.02e	0.47 ± 0.03c	0.82 ± 0.02d
CN (+)	0.17 ± 0.03a	0.15 ± 0.02a	0.09 ± 0.01a	0.14 ± 0.01a

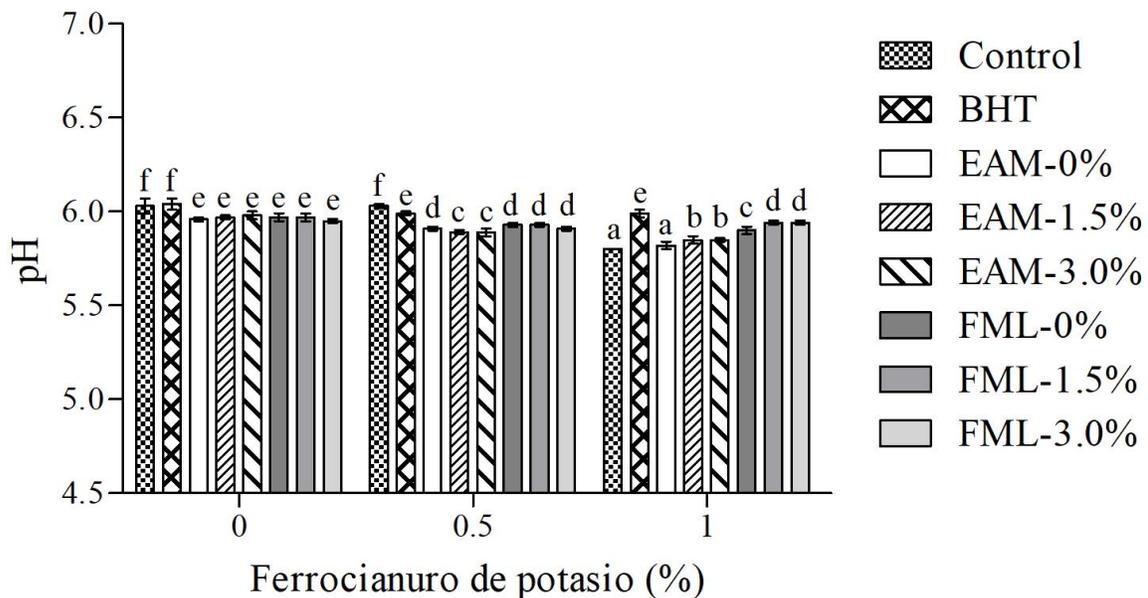
Los datos son expresados como media ± desviación estándar (n = 6). CN (-), control negativo; CN (+), control positivo (cloranfenicol a 100 µg/mL); EAM, extracción asistida por maceración; FML, fermentación en medio líquido; D.O., densidad óptica. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

En acuerdo con los resultados del presente estudio, en una investigación previa se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de diferentes residuos agroindustriales (cáscara de piña, mango, plátano, nuez, cacahuete y coco) obtenidos por FML con micelio de *P. pulmonarius* (26 °C/150 rpm/18 días). Los resultados de este trabajo mostraron un incremento en la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* en el extracto de obtenido por FML (cáscara de cacahuete > cáscara de piña; 1000 µg/mL), al comparar con el control. Aunque, al evaluar el efecto de los extractos contra otra bacteria Gram-positiva (*Bacillus subtilis*) no se observaron diferencias entre tratamientos. Respecto a las bacterias Gram-negativas, se incrementó la actividad contra *S. typhimurium* cuando se utilizó el extracto obtenido por FML (cáscara de cacahuete = cáscara de piña; 1000 µg/mL), respecto al control. No obstante, no se observaron diferencias al evaluar el efecto de los extractos contra *E. coli*. El antibiótico amoxicilina presentó los valores más altos de inhibición contra todas las cepas utilizadas (Ogidi *et al.*, 2020).

#### 6.4. Actividad Antioxidante y Antimicrobiana de los Extractos en Homogenizados de Carne de Cerdo

Los resultados encontrados en investigaciones previas al presente estudio demuestran el uso de la FML como método alternativo a la EAM, para la obtención de extractos ricos en metabolitos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas a partir de residuos de la industria del café. Por lo que, estos extractos pudieran ser utilizados como posibles aditivos conservadores para productos cárnicos. En este contexto, los resultados obtenidos de la evaluación de pH del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 5**), indicaron que estos valores fueron afectados significativamente por la

adición de los antioxidantes y por el nivel del agente oxidante (ferrocianuro de potasio) ( $P < 0.001$ ). En el grupo de muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio) los tratamientos control y BHT presentaron los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más altos de pH (promedio de 6.03), en comparación con el resto de los tratamientos (promedio de 5.97). Los valores de pH disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) por la adición de ferrocianuro de potasio, en dependencia de la concentración. Además, en el grupo de muestras oxidadas al más alto nivel (1% de ferrocianuro de potasio), el tratamiento BHT (valor de 5.99) y los tratamientos FML-1.5% y FML-3.0% (promedio de 5.94) presentaron altos valores de pH ( $P < 0.05$ ), en comparación con el control (5.80).

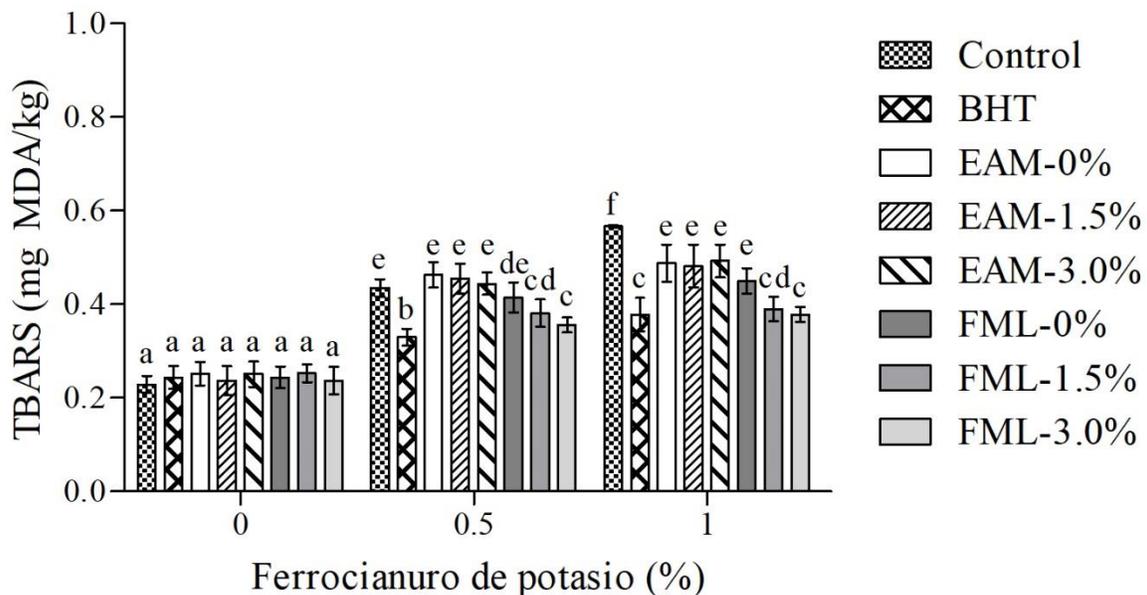


**Figura 5.** Valores de pH del homogenizado de carne de cerdo adicionado con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

En carne de cerdo molida sin cocinar Fernández-López *et al.* (2000) reportan un valor de pH de  $5.73 \pm 0.1$ , valor que es ligeramente menor al reportado en nuestras muestras. Además, en relación con la formulación de productos cárnicos y su efecto sobre los valores de pH, no se reportan estudios sobre la inclusión de extractos de residuos agroindustriales obtenidos por FML. No obstante, se ha demostrado el uso de extractos obtenidos a partir de diferentes residuos de café en la formulación de productos cárnicos. Por ejemplo, en un estudio se evaluó la estabilidad oxidativa

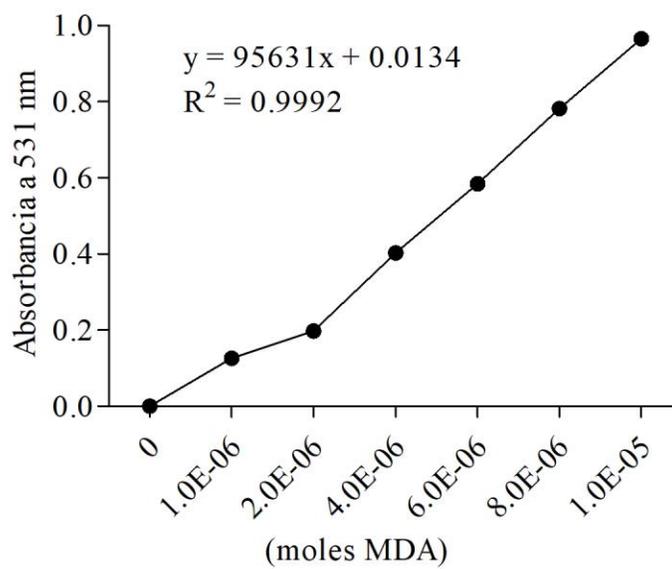
de hamburguesas de pollo sin cocinar adicionadas con un extracto acuoso-etanólico (1:1) de cáscara de café. Las muestras de este estudio fueron sometidas a cuatro tratamientos, el primero consistió en un tratamiento control (sin la adición de antioxidantes), un segundo tratamiento como control positivo (adición de BHT), y dos tratamientos que incluyeron 100 y 200 ppm del extracto. En contraste con el presente estudio, los resultados mostraron que la adición de estos extractos en las hamburguesas de pollo sin cocinar no afectó los valores de pH del producto formulado. Sin embargo, en este estudio no se evaluaron los cambios del pH por el tiempo de almacenamiento o la oxidación de un agente oxidante (de Farias-Marques *et al.*, 2022). El pH es considerado uno de los atributos más importantes al evaluar la calidad de la carne y los productos cárnicos, debido a que se ha demostrado que una disminución en el valor de pH provoca un impacto negativo en los atributos sensoriales (apariencia, color, olor, sabor textura y aceptabilidad general) y en la estabilidad oxidativa de la carne (Kim *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos al evaluar el contenido de TBARS del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 6**), indicaron que estos valores fueron afectados significativamente por la adición de los antioxidantes y el nivel del agente oxidante ( $P < 0.001$ ). En las muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio) no se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los valores de TBARS entre los tratamientos (promedio de 0.248 mg MDA/kg). También se observa que los valores de TBARS incrementaron significativamente ( $P < 0.05$ ) por la adición de ferrocianuro de potasio, en dependencia de la concentración. Además, en el grupo de muestras oxidadas con 1% de ferrocianuro de potasio, los tratamientos BHT, FML-1.5% y FML-3.0% presentaron los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajos de TBARS (0.38 mg MDA/kg), en comparación con las muestras del control (0.567 mg MDA/kg).



**Figura 6.** Valores de TBARS del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

En la **Figura 7** se muestra la curva de calibración para la cuantificación de MDA. En la literatura se ha reportado que la oxidación de lípidos ocurre a través de una reacción en cadena de radicales libres que se presenta en tres pasos (iniciación, propagación y terminación). Los hidroperóxidos lipídicos (ROOH) han sido identificados como productos primarios de la autooxidación, mientras que los productos de la descomposición de ROOH, así como alcoholes, cetonas, ácidos orgánicos volátiles, aldehídos, entre otros, son reconocidos como productos secundarios. Los productos aldehídicos como el MDA pueden ser cuantificados por la reacción que estos pueden presentar con el ácido tiobarbitúrico (método sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico – TBARS), por lo que, este método se usa comúnmente como índice de oxidación en carne y productos cárnicos (Papuc *et al.*, 2017; Pfalzgraf *et al.*, 1995).

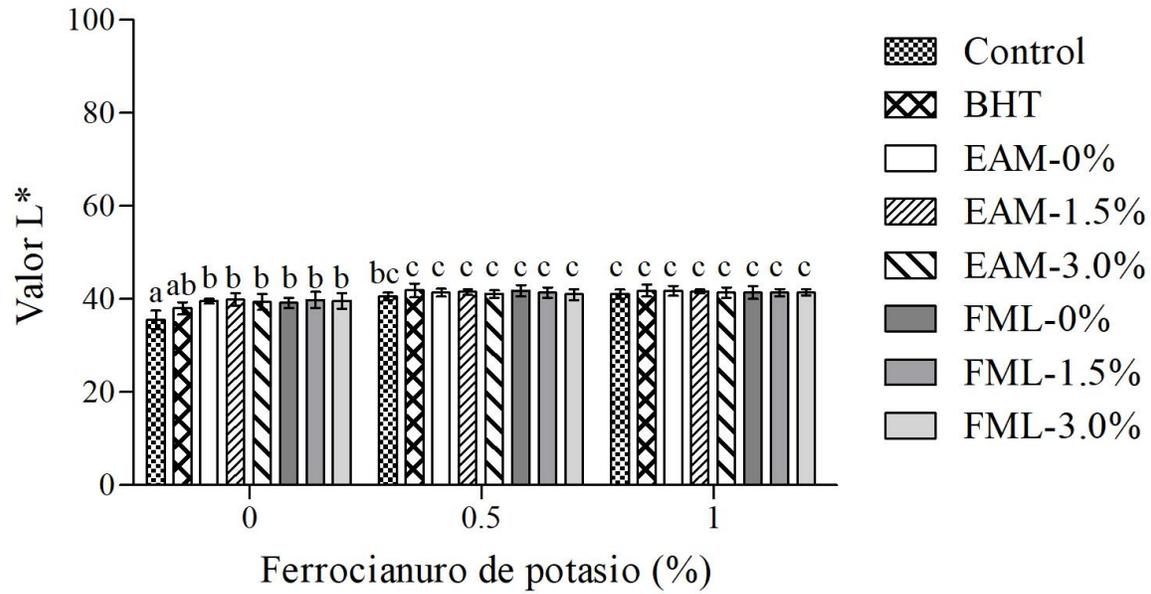


**Figura 7.** Curva de calibración para la cuantificación de malondialdehído (MDA).

En acuerdo con los resultados del presente estudio, en un trabajo preliminar se evaluó la estabilidad oxidativa de homogenizados cárnicos tratados con extracto acuoso de bagazo de café obtenido por FML con *Pleurotus ostreatus*, y sometidas a tratamiento térmico (65 °C/30 min). Los resultados mostraron una reducción en el contenido de MDA en las muestras tratadas con el extracto obtenido por FML, respecto a las muestras del control (Torres-Martínez *et al.*, 2022). No se reportan estudios sobre la inclusión de extractos de residuos agroindustriales obtenidos por FML, en la formulación de productos cárnicos y su efecto sobre los valores de oxidación de lípidos. No obstante, se ha demostrado el uso de harinas o extractos obtenidos a partir de diferentes residuos de café en la formulación de productos cárnicos (Kim *et al.*, 2016; Jully *et al.*, 2016; Martuscelli *et al.*, 2021). Como ejemplo, en un estudio se reportó que la adición de extractos etanólicos de bagazo de café (500 y 1000 ppm) disminuyó los valores de TBARS en homogenizados cárnicos y hamburguesas de res cocidas durante su almacenamiento (37 °C/12 h y 4 °C/5 días, respectivamente), en comparación con las muestras del grupo control (Kim *et al.*, 2016). En otra investigación, se demostró que con la adición de harina de bagazo de café (1 g/kg) disminuyeron los valores de TBARS de hamburguesas de cerdo cocidas almacenadas -18 °C por 3 meses, en comparación con las muestras control (Jully *et al.*, 2016). También, se ha reportado que la adición de harina de cascarrilla de café (1.5 y 3.0%) disminuyó los valores de TBARS de hamburguesas de pollo

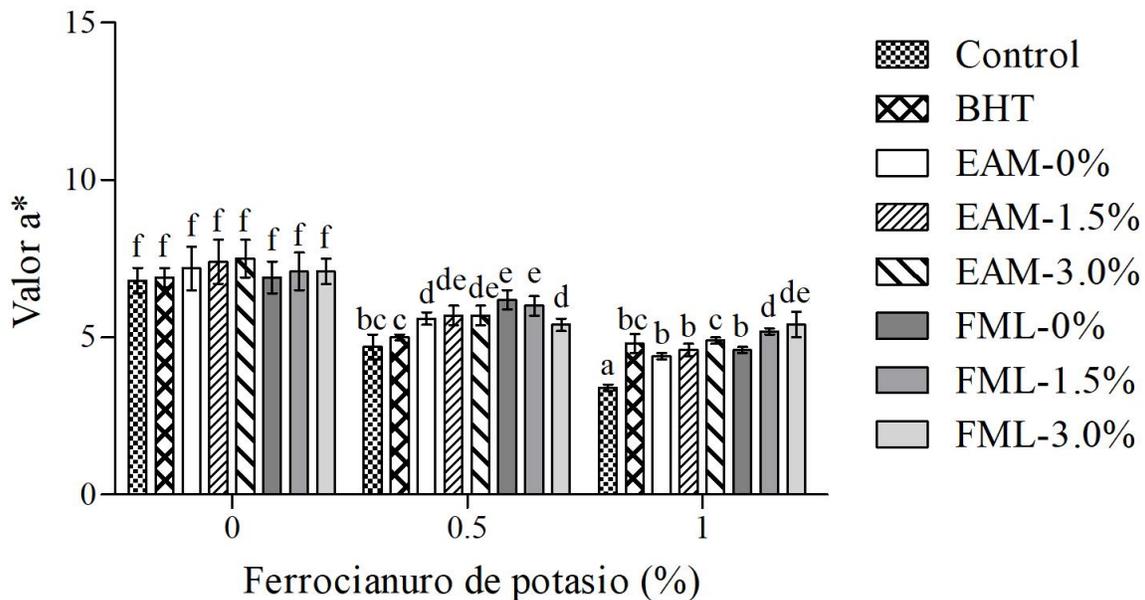
cocinadas y almacenadas a 4 °C por 120 h, respecto al control (Martuscelli *et al.*, 2021). Además, se ha reportado que los compuestos fenólicos presentan alta capacidad para reducir la formación de MDA, lo cual se asocia a su capacidad para donar átomos de hidrógeno de sus grupos OH y a la habilidad que estos tienen para interactuar con las bicapas de fosfolípidos (Saija *et al.*, 1995). Por otra parte, el color es considerado una característica fisicoquímica subjetiva ya que existe únicamente en los ojos y el cerebro del observador (es decir, no es una característica propia del objeto observado), por lo que, este parámetro juega un papel muy importante en la percepción de la calidad, debido a que se asocia con la frescura, sabor, ternura, seguridad, tiempo de conservación, nivel de satisfacción y valor nutricional. Con relación a los posibles cambios en el color de la carne y los productos cárnicos, se ha reportado que pueden estar asociados a una reducción en los valores de pH, así como que, un incremento en los niveles de oxidación de lípidos está asociado con cambios en el color de la carne y los productos cárnicos (Brewer *et al.*, 2001; Papuc *et al.*, 2017; Tomasević *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos de la evaluación de L\* del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 8**), indican que estos valores fueron afectados significativamente por la adición de los antioxidantes y por el nivel del agente oxidante ( $P < 0.001$ ). En el grupo de muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio), tratamientos control y BHT, presentaron los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajos de L\* (promedio de 36.5), en comparación con el resto de los tratamientos (promedio de 39.6). Los valores de L\* no fueron afectados por la adición de ferrocianuro de potasio ( $P > 0.05$ ). Además, en el grupo de muestras oxidadas con 1% de ferrocianuro de potasio, no se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los valores de L\* entre los tratamientos (valor promedio de 41.5).



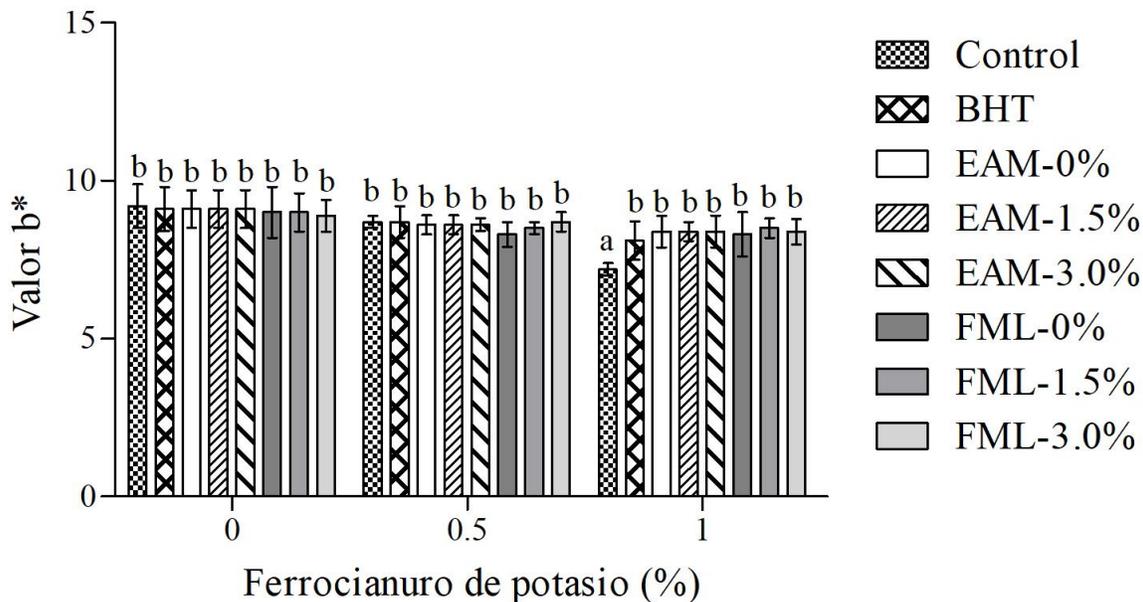
**Figura 8.** Valores de L\* del homogenizado de carne de cerdo adicionado con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

Los resultados obtenidos de la evaluación del valor a\* del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 9**), indicaron que estos valores fueron afectados significativamente por la adición de los antioxidantes y por el nivel del agente oxidante ( $P < 0.001$ ). En el grupo de muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio) no se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los valores de a\* entre tratamientos (promedio de 7.1). También se observa que los valores de a\* disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) por la adición de ferrocianuro de potasio, en dependencia de la concentración utilizada. Además, en el grupo de muestras oxidadas con 1% de ferrocianuro de potasio, los tratamientos FML-1.5% y FML-3.0% presentaron los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más altos de a\* con un promedio de 5.3, en comparación con las muestras del control (3.4). Estos resultados evidenciaron la protección ejercida por la adición de los extractos, al proteger a las muestras contra el deterioro de pigmentos presentes en la carne.



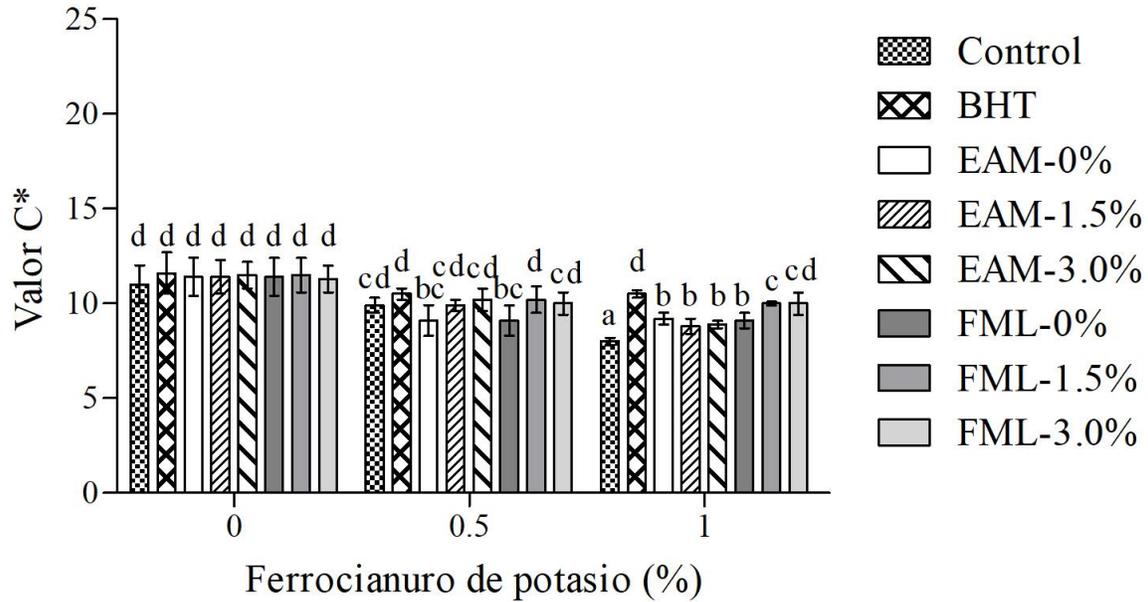
**Figura 9.** Valores de a\* del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de b\* del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 10**), indican que estos valores fueron afectados significativamente por la adición de los antioxidantes y por el nivel del agente oxidante utilizado ( $P < 0.001$ ). En el grupo de muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio) no se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los valores de b\* entre tratamientos (valor promedio de 9.1). Los valores de b\* no fueron afectados por la adición de ferrocianuro de potasio ( $P > 0.05$ ). Además, en el grupo de muestras oxidadas con 1% de ferrocianuro de potasio, los tratamientos en los que se adicionaron los antioxidantes presentaron los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más altos de b\* (valor promedio de 8.4), en comparación con las muestras del control (valor de 7.2).



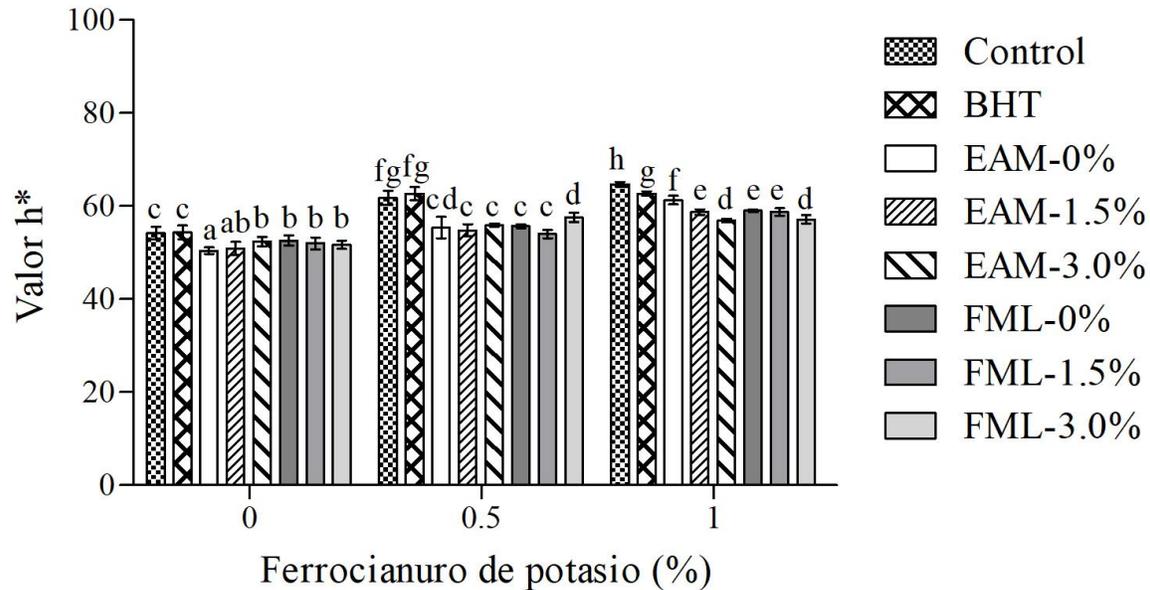
**Figura 10.** Valores de b\* del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

Los resultados obtenidos respecto a la evaluación de C\* del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 11**), indicaron que estos valores fueron afectados significativamente por la adición de los antioxidantes y el nivel del agente oxidante ( $P < 0.001$ ). En el grupo de muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio) no se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los valores de C\* entre tratamientos (valor promedio de 11.4). Los valores de C\* disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) por la adición de ferrocianuro de potasio, en dependencia de la concentración; y el grupo de muestras oxidadas con 1% de ferrocianuro de potasio, los tratamientos BHT y FML-3.0% presentaron los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más altos de C\* con un promedio de 10.3, en comparación con las muestras del control (8.0).



**Figura 11.** Valores de C\* del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

Los resultados obtenidos en la evaluación de  $h^*$  del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 11**), indicaron que estos valores fueron afectados significativamente por la adición de los antioxidantes y por el nivel del agente oxidante ( $P < 0.001$ ). En el grupo de muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio) el tratamiento control y BHT presentaron los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más altos de  $h^*$  (valor promedio de 54.3), en comparación con el resto de los tratamientos (valores  $< 51.0$ ). Los valores de  $h^*$  aumentaron significativamente ( $P < 0.05$ ) por la adición de ferrocianuro de potasio, en dependencia de la concentración. Además, en el grupo de muestras oxidadas con 1% de ferrocianuro de potasio, los tratamientos EAM-3.0% y FML-3.0% presentaron los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajos de  $h^*$  (valor promedio de 57.0), en comparación con las muestras del control (valor de 64.7).



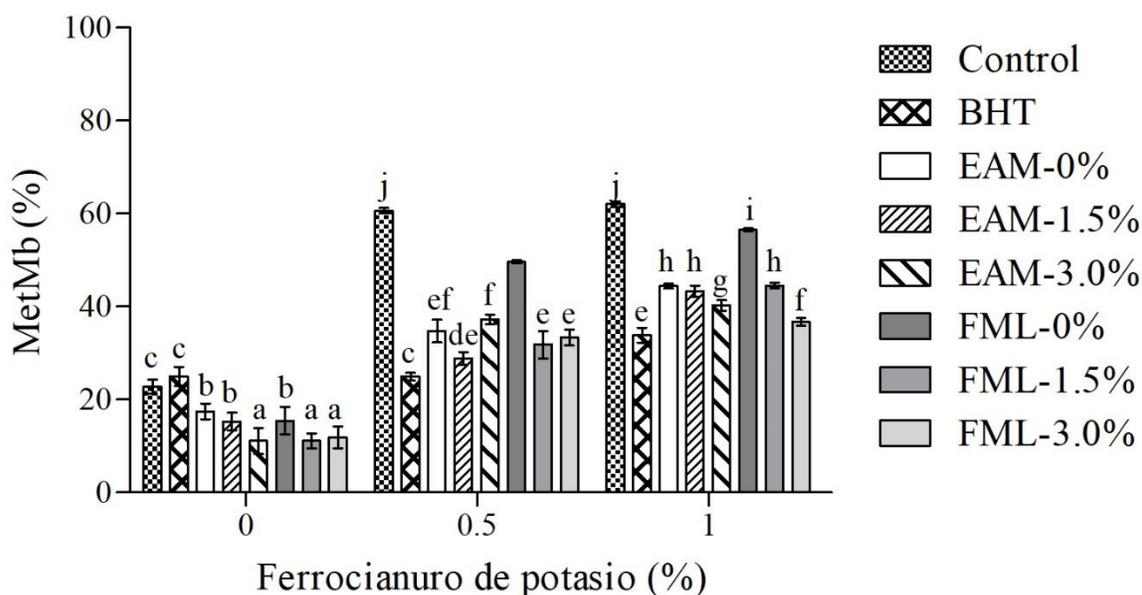
**Figura 12.** Valores de  $h^*$  del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

El parámetro  $L^*$  mide la luminosidad y los valores varían de 0 (negro) a 100 (blanco), y es comúnmente considerado un indicador de la condición PSE en carne (pálida, suave y exudativa y/o DFD (oscura, firme y seca). Además, el parámetro  $a^*$  (índice de rojo) se considera más útil que el parámetro  $b^*$  (índice de amarillo), debido a que  $a^*$  mide los cambios de color entre rojo y verde en la superficie de la carne. Mientras que, el parámetro  $C^*$  (cromaticidad) se ha descrito como un buen indicador de los cambios de color, ya que este disminuye cuando decrecen los valores de pH y  $a^*$ , así como cuando se incrementan los valores del parámetro  $h^*$  (ángulo de matiz o tono) y la formación de MetMb (Brewer *et al.*, 2001; Tomasević *et al.*, 2018).

En relación al color de la carne fresca molida de cerdo, Fernández-López *et al.* (2000) reportaron valores cercanos a los obtenidos en nuestro estudio para los parámetros  $L^* = 42$  vs 40,  $a^*$ , 8 vs 7.1, y  $b^* 10.5$  vs 9.1; no obstante, con diferencias para los valores obtenidos de  $C^*$  (14 vs 10.3) y  $h^*$  (60 vs 55) fueron diferentes. Además, en relación con la formulación de productos cárnicos y su efecto sobre los cambios del color, no se reportan estudios sobre la inclusión de extractos de residuos agroindustriales obtenidos por FML. No obstante, en un estudio reciente se evaluó la estabilidad oxidativa de hamburguesas de pollo sin cocinar adicionadas con un extracto acuoso-etanólico (1:1) de cáscara de café durante su almacenamiento (-18 °C/45 días). Los tratamientos de este estudio fueron cuatros, de los cuales, el primero consistió en un control (sin la adición de

antioxidantes), un segundo tratamiento como control positivo (adición de BHT), y dos tratamientos que incluyeron la adición de 100 y 200 ppm del extracto. Los resultados indicaron que, a la más alta concentración de adición de estos extractos en el producto cárnico, se presentó un menor incremento en los valores de L\* y altos valores en los parámetros a\* y b\* (de Farias-Marques *et al.*, 2022).

En relación con los resultados obtenidos de la determinación de la formación de MetMb del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 13**), estos indican que los valores fueron afectados significativamente por la adición de los antioxidantes y por el nivel del agente oxidante utilizado ( $P < 0.001$ ).

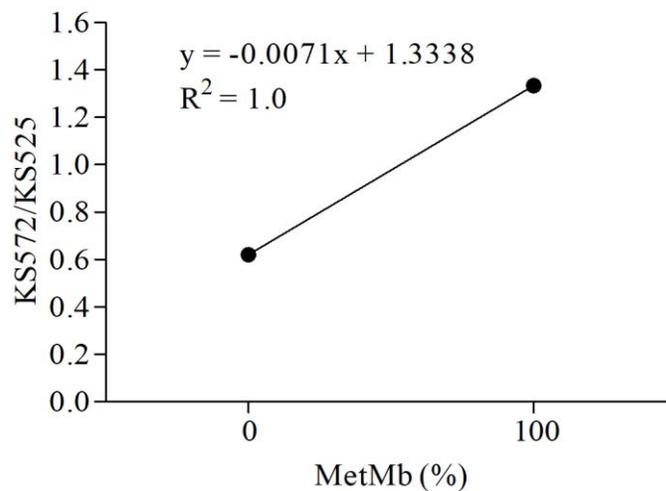


**Figura 13.** Valores de MetMb del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

En el grupo de muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio) los tratamientos EAM-3.0%, FML-1.5% y FML-3.0% presentaron los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajos de formación de MetMb (valor promedio de 11.4%), en comparación con el control y BHT (valor promedio de 23.8%). Los valores de MetMb se incrementaron ( $P < 0.05$ ) por la adición de ferrocianuro de potasio, en dependencia de la concentración utilizada. Además, en el grupo de muestras oxidadas con 1% de ferrocianuro de potasio, los tratamientos BHT y FML-3.0% presentaron valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajos de MetMb (valores de 33.9% y 36.7%,

respectivamente), en comparación con las muestras control (valor de 62.0%).

En la **Figura 14** se muestra la curva de calibración para la cuantificación de MetMb. La mioglobina (Mb) es la principal proteína responsable del color de la carne fresca, por lo que es importante el conocimiento de los factores que promueven decoloración de esta, y como retrasarla o evitarla. La decoloración es el proceso mediante el cual se da la formación de MetMb, el cual resulta de la oxidación del ion ferroso de la Mb a iones férricos: oxi-mioglobina (OMb) + consumo de oxígeno o baja presión parcial de ( $O_2$ ) – e-  $\rightarrow$  MetMb +  $O_2^-$  (Bekhit y Faustmant, 2005).



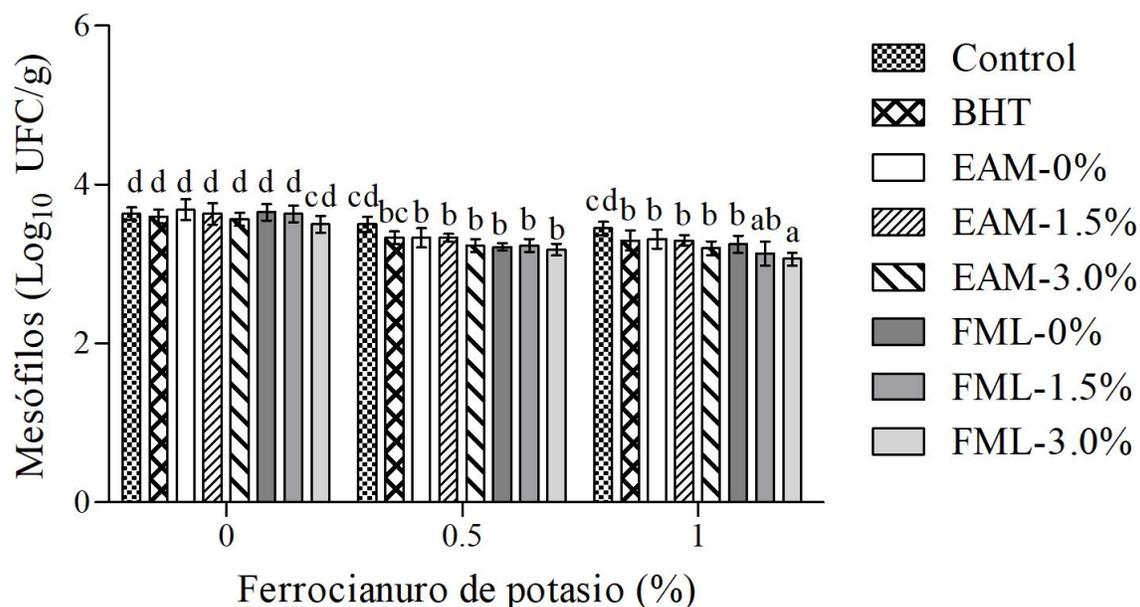
**Figura 14.** Curva de calibración para la cuantificación de metamioglobina (MetMb).

En relación con la inclusión de extractos de residuos agroindustriales obtenidos por FML, no se reportan estudios sobre el uso de estos en la formulación de productos cárnicos y su efecto sobre los cambios en la formación de MetMb. No obstante, en un trabajo de investigación se evaluó el efecto de la adición de harina de bagazo de café ligero y oscuro (1 g/kg) sobre la formación MetMb en hamburguesas de cerdo cocidas almacenadas -18 °C por tres meses. En acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, al inicio del almacenamiento (día 0) se observó una reducción en el contenido de MetMb en las muestras adicionadas con harina de bagazo de café (ligero > oscuro). Mientras que, en el último día de almacenamiento, las muestras adicionadas con harina de bagazo de café ligero presentaron la menor formación de MetMb, en comparación con las muestras control y con las muestras en las que se adicionó harina de bagazo de café oscuro

(Jully *et al.*, 2016). En relación con el grado de aceptación de la formación de MetMb, se ha reportado que con valores superiores al 40% el producto es rechazado por el consumidor (Greene *et al.*, 1971); por lo que es importante adicionar aditivos que retrasen la formación de este compuesto.

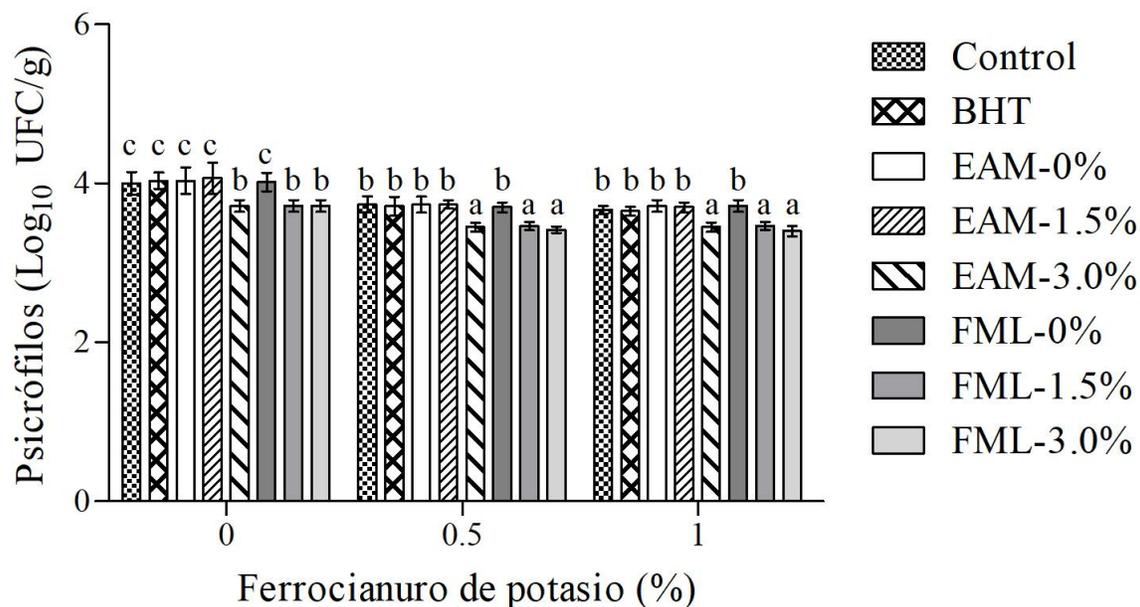
Por otra parte, se ha reportado que los aditivos alimentarios además de ser utilizados como estabilizadores del proceso oxidativo, estos pueden prolongar la vida de anaquel de los alimentos reduciendo el deterioro causado por microorganismos o protegiéndolos contra el crecimiento de microorganismos patógenos (Efenberger-Szmechtyk *et al.*, 2021). Los extractos obtenidos de fuentes naturales contienen diversos compuestos bioactivos que inhiben el crecimiento de microorganismos, especialmente bacterias, cuyo mecanismo de acción es asociado comúnmente a características estructurales. En base a su estructura, estos compuestos pueden causar cambios fisiológicos en la bacteria dañando su pared, afectar la biosíntesis de proteínas, los procesos metabólicos e inhibiendo la síntesis de ATP y ADN (Efenberger-Szmechtyk *et al.*, 2021; Papuc *et al.*, 2017).

Respecto a los resultados obtenidos en la evaluación de la cuenta total de mesófilos aerobios del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 15**), estos indican que los valores fueron afectados significativamente por la adición de los antioxidantes y el nivel del agente oxidante utilizado ( $P < 0.001$ ). En el grupo de muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio) no se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la cuenta total de mesófilos aerobios entre tratamientos con un promedio de  $3.6 \log_{10}$  UFC/g. Los valores de cuenta total de mesófilos aerobios disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) por efecto de la adición de ferrocianuro de potasio, en dependencia de la concentración usada. Además, en el grupo de muestras oxidadas con 1% de ferrocianuro de potasio, el tratamiento FML-3.0% presentó los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajos de la cuenta total de mesófilos aerobios con  $3.1 \log_{10}$  UFC/g, en comparación con las muestras control con  $3.5 \log_{10}$  UFC/g.



**Figura 15.** Cuenta total de mesófilos aerobios del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

En relación con los resultados obtenidos de la cuenta total de psicrófilos aerobios del homogenizado de carne de cerdo (**Figura 16**), estos indican que los valores fueron afectados significativamente por la adición de los antioxidantes y el nivel del agente oxidante utilizado ( $P < 0.001$ ). En el grupo de muestras sin oxidar (0% de ferrocianuro de potasio) los tratamientos EAM-3.0%, FML-1.5% y FML-3.0% presentan los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajos de la cuenta total de psicrófilos aerobios con un promedio de  $3.4 \log_{10}$  UFC/g, en comparación con el resto de los tratamientos (valor promedio de  $4.0 \log_{10}$  UFC/g). Los valores de cuenta total de psicrófilos aerobios disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) por la adición de ferrocianuro de potasio, en dependencia de la concentración utilizada. En el grupo de muestras oxidadas con 1% de ferrocianuro de potasio, los tratamientos EAM-3.0%, FML-1.5% y FML-3.0% presentan los valores significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajos de la cuenta total de psicrófilos aerobios con un promedio de  $3.3 \log_{10}$  UFC/g, en comparación con los otros tratamientos con  $3.7 \log_{10}$  UFC/g.



**Figura 16.** Cuenta total de psicrófilos aerobios del homogenizado de carne de cerdo adicionada con extracto acuoso de cascarilla de café y pro-oxidado con ferrocianuro de potasio.

De acuerdo con las normativas mexicanas los recuentos microbianos en un alimento no deben exceder el máximo permisible, es decir, 6 Log<sub>10</sub> UFC/g (NOM, 1993). No se reportan estudios sobre la inclusión de extractos de residuos agroindustriales obtenidos por FML y EAM, en la formulación de productos cárnicos y su efecto sobre el crecimiento de bacterias mesófilas y psicrófilas. No obstante, se ha propuesto el uso de compuestos bioactivos obtenidos a partir de residuos agroindustriales por FML utilizando hongos, con el fin de desarrollar nuevos aditivos alimentarios (Vargas-Sánchez *et al.*, 2021).

## 7. CONCLUSIONES

1. Los resultados mostraron un efecto significativo del método de extracción y el nivel de cascarilla de café utilizado sobre el contenido de metabolitos, actividad antioxidante y antimicrobiana.
2. El mayor contenido de carbohidratos lo presentó el extracto EAM-0%, mientras que el mayor contenido de fenoles, flavonoides y ácido cafeoilquínico total, el extracto FML-3.0%.
3. Los valores más altos de actividad antirradical DPPH<sup>•</sup> lo presentó el extracto EAM-3.0%, mientras que la mayor actividad antirradical ABTS<sup>•+</sup> el extracto FML-3.0%. Respecto al poder reductor, FML-3.0% presentó el valor más alto de PR y los extractos EAM-1.5% y FML-3.0% los valores más altos de FRAP.
4. La mayor inhibición contra bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*) lo presentaron los tratamientos EAM-1.5% y EAM-3.0%. Respecto a las bacterias Gram-negativas, la mayor inhibición contra *Escherichia coli* se observó con los tratamientos EAM-1.5%, EAM-3.0% y FML-3.0%; mientras que, los extractos EAM-3.0%, FML-0%, FML-1.5% y FML-3.0% presentaron el mayor efecto contra *Salmonella typhimurium*.
5. Los resultados de las pruebas de estabilidad antioxidante y actividad antimicrobiana del homogenizado de carne de cerdo mostraron un efecto significativo del tratamiento y nivel de pro-oxidación.
6. La incorporación de los extractos (FML > EAM) al homogenizado de carne de cerdo, redujo significativamente los cambios en los valores de pH, oxidación de lípidos, color y formación de metamioglobina, así como la cuenta total de mesófilos y psicrófilos aerobios.

## **8. RECOMENDACIONES**

1. Obtener extractos de otros residuos agroindustriales mediante extracción asistida por fermentación en medio líquido y medio sólido con diferentes especies de hongos comestibles.
2. Determinar el contenido de compuestos bioactivos y propiedades biológicas de extractos obtenidos por fermentación fúngica de nuevos residuos agroindustriales.
3. Evaluar el efecto de la inclusión de nuevos extractos en diferentes niveles de adición sobre la estabilidad oxidativa y antimicrobiana en diferentes productos cárnicos, durante su almacenamiento.

## 9. REFERENCIAS

- Ainsworth E.A. y Gillespie K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2(4):875–877.
- Al-Yousef H.M. y Amina M. 2018. Essential oil of *Coffea arabica* L. Husks: A brilliant source of antimicrobial and antioxidant agents. *Biomed. Res. (India)*. 29(1):174–180.
- Albalasmeh A.A., Berhe A.A. y Ghezzehei T.A. 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.* 97(2):253–261.
- Ameca G.M., Cerrilla M.E.O., Córdoba P.Z., Cruz A.D., Hernández M.S. y Haro J.H. 2018. Chemical composition and antioxidant capacity of coffee pulp. *Ciênc. Agrotec.* 42(3):307–313.
- Angeloni S., Nzekoue F.K., Navarini L., Sagratini G., Torregiani E., Vittori S. y Caprioli G. 2020. An analytical method for the simultaneous quantification of 30 bioactive compounds in spent coffee ground by HPLC-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* 55(11):e4519.
- Association of Official Analytical Chemists, AOAC. 2005. Official Methods of Analysis; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, Maryland, USA.
- Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A. y Omar A.K.M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.* 117:426–436.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6(2):71–79.
- Bekhit A.E.D. y Faustman C. 2005. Metmyoglobin reducing activity. *Meat Sci.* 71(3):407–439.
- Ben-Romdhane M., Krichen F., Ghazala I., Ellouz-Chaabouni S. y Haddar A. 2017. Effect of extraction methods on chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of coffee residue. *J. Food Process. Preserv.* 41(2):e12768.
- Berker K.I., Güçlü K., Tor İ., Demirata B. y Apak R. 2010. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/prussian blue method. *Food Anal. Methods.* 3(3):154–168.
- Bouhlal F., Aqil Y., Chamkhi I., Belmaghraoui W., Labjar N., Hajjaji S.E., Benabdellah G.A., Aurag J., Lotfi E.M. y Mahi M.E. 2020. GC-MS analysis, phenolic compounds quantification, antioxidant, and antibacterial activities of the hydro-alcoholic extract of spent coffee grounds. *J. Biol. Act. Prod. Nat.* 10(4):325–337.
- Bresciani L., Calani L., Bruni R., Brighenti F. y Del Rio D. 2014. Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Res. Int.* 61:196–201.
- Brewer M.S., Zhu L.G., Bidner B., Meisinger, D.J. y McKeith F.K. 2001. Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Sci.* 57(2):169–176.
- Calvo J. y Marínez-Martínez L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Eferm.*

Infec. Microbiol. Clin. 27(1):44–52.

- Campos-Vega R., Loarca-Pina G., Vergara-Castaneda H.A. y Oomah B.D. 2015. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends Food Sci. Technol.* 45(1):24–36.
- Chandra P. y Arora D.S. 2016. Production of antioxidant bioactive phenolic compounds by solid-state fermentation on agro-residues using various fungi isolated from soil. *Asian J. Biotechnol.* 8:8–15.
- Choi J.W., Ra K.S., Kim S.Y., Yoon T.J., Yu K.W., Shin K.S., Lee S.P. y Suh H.J. 2010. Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel. *Bioresour. Technol.* 101:6028–6034.
- Confortin F.G., Marchetto R., Bettin F., Camassola M., Salvador M. y Dillon A.J.P. 2008. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *J. Ind. Microb. Biotechnol.* 35(10):1149.
- de Farias Marques A.D.J., de Lima Tavares J., de Carvalho L.M., Abreu T.L., Pereira D.A., Santos M.M.F., Madruga M.S., de Medeiros L.L. y Bezerra T.K.A. 2022. Oxidative stability of chicken burgers using organic coffee husk extract. *Food Chem.* 393:133451.
- Das R.K., Brar S.K. y Verma M. 2015. A fermentative approach towards optimizing directed biosynthesis of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* 1526 utilizing apple industry waste biomass. *Fungal Biol.* 119:1279–1290.
- Dey T.B., Chakraborty S., Jain K.K., Sharma A. y Kuhad R.C. 2016. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid-state fermentation process: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 53:60–74.
- Díaz-Hernández GC., Alvarez-Fitz P., Maldonado-Astudillo Y.I., Jiménez-Hernández J., Parra-Rojas I., Flores-Alfaro E., Salazar R. y Ramírez M. 2022. Antibacterial, antiradical and antiproliferative potential of green, roasted, and spent coffee extracts. *Appl. Sci.* 12(4):1938.
- Duangjai A., Suphrom N., Wungrath J., Ontawong A., Nuengchamnong N. y Yosboonruang A. 2016. Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integr. Med. Res.* 5(4):324–331.
- Efenberger-Szmechtyk M., Nowak A. y Czyzowska, A. 2021. Plant extracts rich in polyphenols: Antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61(1):149–178.
- Falowo A.B., Fayemi P.O. y Muchenje V. 2014. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res. Int.* 64:171–181.
- Fan L., Pandey A., Moha, R. y Soccol C.R. 2000. Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotechnol.* 20(1):41–52.
- Greene B.E., Hsin I.M. y Zipser M.Y.W. 1971. Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *J. Food Sci.* 36(6):940-942.
- Griffiths D.W., Bain H. y Dale M.F.B. 1992. Development of a rapid colorimetric method for the determination of chlorogenic acid in freeze-dried potato tubers. *J. Sci. Food Agric.* 58(1):41–48.

- Hashimoto T.A., Caporaso F., Toto C. y Were L. 2019. Antioxidant capacity and sensory impact of coffee added to ground pork. *Eur. Food Res. Tech.* 245(5):977–986
- Huang Y.C., Chen Y.F., Chen C.Y., Chen W.L., Ciou Y.P., Liu W.H. y Yang C.H. 2011. Production of ferulic acid from lignocellulolytic agricultural biomass by *Thermobifida fusca* thermostable esterase produced in *Yarrowia lipolyticatransformant*. *Bioresour. Technol.* 102:8117–8122
- Janissen B. y Huynh T. 2018. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resour. Conserv. Recy.* 128:110–117.
- Jiménez-Zamora A., Pastoriza S. y Rufián-Henares J.A. 2015. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT-Food Sci. Technol.* 61(1):12–18.
- Jorgensen J.H. y Turnidge J.D. 2015. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In J. H. Jorgensen, K. C. Carroll, G. Funke, M. A. Pfaller, M. L. Landry, S. S. Richter, D. W. Warnock (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (pp. 1253-1273). Washington DC: AMS press.
- Jully K.M.M., Toto C.S. y Were L. 2016. Antioxidant effect of spent, ground, and lyophilized brew from roasted coffee in frozen cooked pork patties. *LWT-Food Sci. Technol.* 66:244–251.
- Khochapong W., Ketnawa S., Ogawa Y. y Punbusayakul N. 2021. Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extract. *Food Chem.* 348:129094.
- Kim Y.H.B., Warner R.D. y Rosenvold K. 2014. Influence of high pre-rigor temperature and fast pH fall on muscle proteins and meat quality: a review. *Anim. Prod. Sci.* 54(4):375–395.
- Kim J.H., Ahn D.U., Eun J.B. y Moon S.H. 2016. Antioxidant effect of extracts from the coffee residue in raw and cooked meat. *Antioxidants.* 5(3):21.
- Lin C., Toto C. y Were L. 2015. Antioxidant effectiveness of ground roasted coffee in raw ground top round beef with added sodium chloride. *LWT-Food Sci. Technol.* 60(1):29–35.
- Liu Z.Q. 2010. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. *Chem. Rev.* 110(10):5675–5691.
- Liu S.R., Zhang W.R. y Kuang Y.B. 2018. Production of stalk spawn of an edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in liquid culture as a suitable substitute for stick spawn in mushroom cultivation. *Sci. Hortic.* 240:572–577.
- Machado E.M., Rodriguez-Jasso R.M., Teixeira J.A. y Mussatto S.I. 2012. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochem. Eng. J.* 60:87–90.
- Martínez-Ávila G.C.G., Ascacio-Valdés J.A., Sepúlveda-Torre L., Rodríguez-Herrera R., Aguilera-Carbó A. y Aguilar C.N. 2013. Extracción asistida por fermentación fúngica de antioxidantes fenólicos. *Rev. Cien. UAdeC.* 5(9).
- Martins S., Mussatto S.I., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C.N. y Teixeira J.A. 2011. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol. Adv.* 29(3):365–373.
- Martuscelli M., Esposito L. y Mastrocola D. (2021). The role of coffee silver skin against oxidative

- phenomena in newly formulated chicken meat burgers after cooking. *Foods*. 10(8):1833.
- Masaphy S. y Levanon D. 1992. The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36(6):828–832.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2):211–219.
- Murillo-Hernández J.L., Torres-Martínez B.M., Vargas-Sánchez R.D., Huerta-Leidenz N.O., Sánchez-Escalante A. y Torrescano-Urrutia G.R. 2019. Coffee bagasse extract enhances antioxidant status of pork patties during chilled storage. Recuperado de: [http://icomst-proceedings.helsinki.fi/papers/2019\\_11\\_27.pdf](http://icomst-proceedings.helsinki.fi/papers/2019_11_27.pdf)
- Murthy P.S. y Naidu M.M. 2012a. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition-A review. *Resour. Conserv. Recy.* 66:45–58.
- Murthy P.S. y Naidu M.M. 2012b. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food Bioproc. Tech.* 5(3):897–903.
- Mussatto S.I., Machado, E.M., Martins, S. y Teixeira J.A. 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food Bioprocess Tech.* 4(5):661–672.
- Nzekoue F.K., Angeloni S., Navarini L., Angeloni C., Freschi M., Hrelia S., Vitali L.A., Sagratini G., Vittori S. y Caprioli G. 2020. Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Res. Int.* 133:109128.
- Nissen L.R., Byrne D.V., Bertelsen G. y Skibsted L.H. 2004. The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Sci.* 68(3):485–495.
- NOM. 1993. Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la carne, carne molida y carne molida moldeada. Recuperado de: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4680418&fecha=23/03/1994#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4680418&fecha=23/03/1994#gsc.tab=0)
- NOM. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Recuperado de: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69533.pdf>
- NOM. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/213ssa102.html>
- Ogidi C.O., Ubaru A.M., Ladi-Lawal T., Thonda O.A., Aladejana O.M. y Malomo O. 2020. Bioactivity assessment of exopolysaccharides produced by *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture with different agro-waste residues. *Heliyon*. 6(12):e05685.
- Okur I., Soyler B., Sezer P., Oztop M.H. y Alpas H. 2021. Improving the recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds (scg) by environmentally friendly extraction techniques. *Molecules*. 26(3):613.
- Palomino-Garcia L.R., Biasetto C.R., Araujo A.R. y Bianchi V.L.D. 2015. Enhanced extraction of phenolic compounds from coffee industry's residues through solid-state fermentation by *Penicillium purpurogenum*. *Food Sci. Technol.* 35(4):704–711.

- Papuc, C., Goran, G.V., Predescu, C.N., Nicorescu, V. y Stefan G. 2017. Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: Classification, structures, sources, and action mechanisms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16:1243–1268.
- Pfalzgraf A., Frigg, M. y Steinhart H. 1995. Alpha-tocopherol contents and lipid oxidation in pork muscle and adipose tissue during storage. *J. Agric. Food Chem.* 43:1339–1342.
- Pisoschi A.M. y Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97:55–74.
- Popova M., Bankova V., Butovska D., Petkov V., Nikolova-Damyanova B., Sabatini A.G., Marcazzan G.L. y Bogdanov S. 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal.* 15(4):235–240.
- Ramírez-Rojo M.I., Vargas-Sánchez R.D., del Mar Torres-Martínez B., Torrescano-Urrutia G.R. y Sánchez-Escalante A. 2018. Extractos de hojas de plantas para conservar la calidad de la carne y los productos cárnicos frescos. *Revisión. Biotecnia.* 20(3):155–164.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26(9-10):1231–1237.
- Ribeiro J.S., Santos M.J.M.C., Silva L.K.R., Pereira L.C.L., Santos I.A., da Silva Lannes S.C. y da Silva M.V. 2019. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. *Meat Sci.* 148:181–188.
- Robertson, A.R., Lozano, R.D., Alman, D.H., Orchard, S.E., Keitch, J.A., Connely, R., Graham, L.A., Acree, W.L., John, R.S., Hoban, R.F., et al. 1977. CIE Recommendations on Uniform Color Spaces, Color-Difference Equations, and Metric Color Terms. *Color Res. Appl.* 2:5–6.
- Rosales E., Pazos M. y Sanromán M.Á. 2018. Solid-state fermentation for food applications. En: A. Pandey, C. Larroche, C. y C.R. Soccol (Eds.). *Current developments in biotechnology and bioengineering.* Elsevier, New York, 319-355 pp.
- Sadh P.K., Chawla P. y Duhan J.S. 2018. Fermentation approach on phenolic, antioxidants and functional properties of peanut press cake. *Food Biosci.* 22:113–120.
- SAGARPA. 2017. *Café mexicano, Planeación agrícola nacional 2017-2030.* Recuperado de: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B\\_sico-Caf\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B_sico-Caf_.pdf)
- Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F. y Castelli F. 1995. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic. Biol. Med.* 19(4):481–486.
- Sant’Anna V., Biondo E., Kolchinski E.M., da Silva L.F.S., Corrêa A.P.F., Bach E. y Brandelli A. 2017. Total polyphenols, antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities of spend coffee ground aqueous extract. *Waste Biomass Valori.* 8(2):439–442.
- Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L.R., Gardner P.T., Heinonen M.I., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L. y Tijburg L. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant

- compounds. *Eur. Food Res. Technol.* 212(3):319–328.
- Shin H.Y., Kim S.M., Lee J.H. y Lim S.T. 2019. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. *Food Chem.* 272:235–241.
- Stewart, M.R., Zipser, M.W. y Watts B.M. 1965. The use of reflectance spectrophotometry for assay of raw meat pigments. *J. Food Sci.* 30:464–469.
- Tang J., Faustman C. y Hoagland T.A. 2004. Krzywicki revisited: Equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extracts. *J Food Sci.* 69(9):C717–C720.
- Thangavelu KP., Tiwari B.K., Kerry, J.P. y Álvarez C. 2022. A comprehensive study on the characterisation properties of power ultrasound-treated apple pomace powder and coffee silverskin powder. *European Food Research and Technology*, 1–11.
- Tomasević I., Tomović V., Milovanović B., Lorenzo J., Đorđević V., Karabasil N. y Đekić I. 2019. Comparison of a computer vision system vs. traditional colorimeter for color evaluation of meat products with various physical properties. *Meat Sci.* 148:5–12.
- Torres-Martínez B.M., Vargas-Sánchez R.D., Torrescano-Urrutia G.R. y Sánchez-Escalante A. 2022. Oxidative stability of meat homogenates treated with spent coffee ground extract obtained by submerged fermentation. Recuperado de: [https://icomst2022.com/img/icomst2022\\_program\\_book.pdf](https://icomst2022.com/img/icomst2022_program_book.pdf)
- Valenzuela C.V. y Pérez P.M. 2016. Antioxidantes naturales obtenidos de frutas y verduras y su efecto sobre la vida útil de la carne y los productos cárnicos: una actualización. *Rev. Chil. Nutr.* 43(2):188–195.
- Vargas-Sánchez R.D., Torres-Martínez B.D.M., Torrescano-Urrutia G.R., Sánchez-Escalante A. y Esqueda M. 2021. Extraction of phenolic compounds from agro-industrial by-products by fungal fermentation with potential use as additives for meat and meat products. A review. *Biotechnia.* 23(3):66–77.
- Wen, L., Zhang, Z., Rai, D., Sun, D. W. y Tiwari B.K. 2019. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from coffee silverskin: Impact on phenolic content, antioxidant activity, and morphological characteristics. *J Food Process Eng.* 42:e13191.
- Wijngaard H., Hossain M.B., Rai D.K. y Brunton N. 2012. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res. Int.* 46:505–513.
- Xu X.Q., Hu, Y. y Zhu L.H. 2014. The capability of *Inonotus obliquus* for lignocellulosic biomass degradation in peanut shell and for simultaneous production of bioactive polysaccharides and polyphenols in submerged fermentation. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45:2851–2858.
- Xu X., Shen M. y Quan L. 2015. Stimulatory agents simultaneously improving the production and antioxidant activity of polyphenols from *Inonotus obliquus* by submerged fermentation. *Appl. Biochem. Biotech.* 176:1237–1250.
- Zhu L. y Xu X. 2013. Stimulatory effect of different lignocellulosic materials for phenolic compound production and antioxidant activity from *Inonotus obliquus* in submerged fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169:2138–2152.