

# **INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PROYECTO

CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LOS  
RESIDUOS SÓLIDOS EN DEGRADACIÓN DERIVADOS DEL BENEFICIO  
HÚMEDO DE *Coffea arabica* EN LA CONCORDIA, CHIAPAS

PRESENTA

HÉCTOR EFRAÍN FONSECA CASTRO

ASESOR INTERNO

DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO

ASESOR EXTERNO

ING. JESÚS CARMONA DE LA TORRE

## RESUMEN

El café es la semilla seca que proviene del cafeto y con la cual se prepara una bebida con el mismo nombre. La especie que tiene mayor importancia económica es *Coffea arabica*, ya que constituye el producto agrícola más importante del comercio mundial con una producción aproximada de 146.3 millones de sacos de 60 kg cada uno de café verde que representa el 30% en peso del fruto de café maduro, el 70% restante son residuos o subproductos generados en el tratamiento de beneficio húmedo, método más utilizado por los agricultores por que produce una mejor calidad de semilla. El residuo más abundante es la pulpa de café que, por su manejo inadecuado, ocasiona un aumento en los niveles de contaminación de las zonas cafetaleras.

Es por ello que en el presente trabajo se realizó la caracterización físico – química mediante un análisis químico proximal (AQP) y la determinación de taninos condensables y energía calorífica dando como resultado la disminución en concentración de taninos condensables, azúcares reductores y carbohidratos tras 4 semanas de degradación natural, mientras que proteína cruda, fibra cruda, cenizas y grasa presentaron aumento con respecto al tiempo.

La estandarización del método de extracción de DNA de la pulpa de café a diferentes tiempos de degradación también se llevó a cabo. El método que presentó mejores resultados en calidad de DNA obtenido fue CTAB 2X con pretratamientos de extracción de ácidos grasos volátiles y lavados con buffer de fosfatos.

Con los resultados obtenidos es posible proponer usos alternativos para mitigar el impacto al medio ambiente como el uso de la pulpa de café como alimento para animales, sustrato para lombricomposta, producción de biogás, entre otros.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	2
2.1 Café.....	2
2.2 Especies y variedades.....	2
2.2.1 <i>Coffea arabica</i> .....	3
2.2.2 <i>Coffea canephora</i> .....	4
2.2.3 <i>Coffea liberica</i> .....	4
2.3 Origen y distribución .....	5
2.4 Producción.....	6
2.4.1 Producción mundial .....	6
2.4.2 Producción nacional.....	7
2.4.3 Producción en Chiapas.....	8
2.5 Proceso.....	9
2.5.1 Recolección del fruto .....	9
2.5.2 Beneficio húmedo .....	9
2.5.2.1 Despulpado .....	10
2.5.2.2 Fermentación.....	10
2.5.2.3 Lavado.....	11
2.5.2.4 Secado.....	11
2.5.3 Trillado .....	12
2.5.4 Torrefacción .....	12
2.6 Residuos .....	12
2.6.1 Usos alternativos.....	13
2.7 Caracterización de la pulpa de <i>C. arabica</i> .....	13
2.7.1 Caracterización físico – química.....	14
2.7.2 Caracterización microbiológica .....	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	15
4. JUSTIFICACIÓN.....	15

5.	OBJETIVOS .....	16
5.1	General.....	16
5.2	Específicos .....	16
6.	METODOLOGÍA.....	17
6.1	Sitio de muestreo .....	17
6.2	Localización del área de estudio .....	17
6.3	Análisis bromatológicos .....	17
6.3.1	Pre tratamiento de la muestra.....	17
6.3.2	Humedad.....	18
6.3.3	Cenizas .....	18
6.3.4	Grasas.....	18
6.3.5	Proteína cruda.....	19
6.3.6	Fibra cruda .....	19
6.3.7	Azúcares reductores.....	20
6.3.8	Carbohidratos.....	21
6.3.9	Taninos condensables .....	21
6.3.10	Energía calorífica .....	21
6.3.11	Análisis de resultados.....	23
6.4	Extracción de DNA.....	23
6.4.1	Pretratamiento de las muestras .....	23
6.4.1.1	Extracción de ácidos grasos volátiles (AGV's).....	24
6.4.1.2	Lavado con buffer de fosfatos .....	24
6.4.2	Método CTAB 2X .....	24
6.4.3	Electroforesis.....	25
6.4.4	Cuantificación de DNA .....	25
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7.1	Caracterización físico-química.....	26
7.1.1	Humedad.....	26
7.1.2	Cenizas .....	27
7.1.3	Grasa .....	28
7.1.4	Proteína cruda.....	28
7.1.5	Fibra cruda .....	29
7.1.6	Azúcares reductores.....	30

7.1.7	Carbohidratos.....	30
7.1.8	Taninos condensables .....	31
7.1.9	Energía calorífica .....	32
7.2	Extracción de DNA.....	32
8.	CONCLUSIONES .....	34
9.	COMPETENCIAS DESARROLLADAS .....	35
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Partes del fruto de café.....	3
Figura 2.- Partes de <i>Coffea arabica</i> L.....	4
Figura 3.- Comparación de los granos de las tres especies más importantes del género <i>Coffea</i> .....	5
Figura 4.- Mapa de África mostrando los centros autóctonos de la diversidad de <i>C. arabica</i> y <i>C. canephora</i> .....	5
Figura 5.- Mapa de siembra de café de acuerdo a la variedad.....	6
Figura 6.- Producción mundial de café, 2002/03 - 2015/16.....	6
Figura 7.- Producción mundial de café, 2014/2015.....	7
Figura 8.- Principales estados productores de café cereza en México.....	8
Figura 9.- Desulpadora tipo tambor horizontal.....	10
Figura 10.- Composición de la materia seca del mucílago de café.....	11
Figura 11.- Niveles de tueste del grano.....	12
Figura 12.- Diseño esquemático de la bomba de oxígeno.....	23
Figura 13.- Gráfica de medias del % de Cenizas a diferentes tiempos de descomposición.....	27
Figura 14.- Gráfica de medias del % de Extracto etéreo de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición.....	28
Figura 15.- Gráfica de medias del contenido de Fibra cruda.....	29
Figura 16.- Comparación gráfica de medias del % de Azúcares reductores en pulpa de café.....	30
Figura 17.- Comparación de las medias de los porcentajes de Taninos Condensables.....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Taxonomía de la planta de cafeto.....	2
Tabla 2.-	Residuos obtenidos en el proceso de beneficio e industrialización de 100 kg de café cereza.....	13
Tabla 3.-	Descripción de las muestras.....	17
Tabla 4.-	Preparación de la curva de calibración utilizando glucosa como estándar.....	20
Tabla 5.-	Preparación de la curva de calibración utilizando catequina como estándar.....	21
Tabla 6.-	Análisis físico-químico de la pulpa de café en diferentes tiempos de descomposición.....	26
Tabla 7.-	Concentración y calidad de las extracciones de ADN a partir de pulpa de café en diferentes tiempos de degradación.....	32

# 1. INTRODUCCIÓN

El café es el producto agrícola más comercializado en los mercados internacionales y ocupa el segundo lugar, solo detrás del petróleo crudo, entre los productos naturales de mayor demanda. En el ciclo de cosecha 2015/16 se produjeron cerca de 152 millones de sacos de 60kg a nivel mundial de los cuales el 60% pertenece a la especie *Coffea arabica*, debido a sus propiedades sensoriales y a una mejor calidad en taza, alcanza precios más altos en el mercado internacional en comparación a las otras especies del género. Chiapas aporta el 36% de la producción nacional siendo el mayor productor de café en el país; La Concordia junto con 9 municipios, concentran el 46% de la producción en el estado.

La calidad del producto final depende de manera directa del tratamiento a los que se somete después de su cosecha, debido a que se obtiene café de mayor calidad, la mayoría de los caficultores utiliza el método de beneficiado húmedo. Esta vía involucra el despulpado, desmucilaginado (utilizando grandes cantidades de agua) y secado del fruto, en cada etapa del proceso se generan residuos líquidos y sólidos que representan el 90% del fruto de café maduro, la pulpa constituye el residuo más abundante del proceso. Cuando no se utiliza adecuadamente genera la mayor fuente de contaminación ambiental en las zonas cafetaleras, esto debido a su alto contenido de material orgánico que provoca un aumento en los niveles de contaminación en los cuerpos receptores.

Ante esta realidad es necesario conocer las características físicas, químicas y microbiológicas de la pulpa de café mediante técnicas bromatológicas y moleculares para aplicar estrategias de manejo o usos alternativos de dichos residuos, que estén al alcance de los productores para mitigar el impacto al medio ambiente.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Café

El café se define como la semilla seca que proviene del cafeto (Temis *et al.*, 2011), arbusto perteneciente a la familia de las Rubiáceas del género *Coffea* (Tabla 1). Esta familia cuenta con alrededor de 500 géneros y más de 6000 especies (Waller *et al.*, 2007). Todas las semillas del género *Coffea* se caracterizan por una hendidura en la parte central. Se encuentran desde pequeños arbustos hasta arboles de más de 10 m, sus hojas son simples, opuestas y con estípulas, varían tanto en tamaño como en textura, sus flores son completas, blancas y tubulares; y los frutos, son drupas de diferentes formas, colores y tamaños dependiendo de la especie (Figura 1) (Suarez, 2012).

Tabla 1.- Taxonomía de la planta de cafeto.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Gentianales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Subfamilia	<i>Ixoroideae</i>
Tribu	<i>Coffeae</i>
Género	<i>Coffea</i>

### 2.2 Especies y variedades

La taxonomía del género *Coffea* ha sido revisada recientemente por Davis *et al.* (2007) quien ha enumerado 103 especies dentro de este género, 41 especies en África, 59 en Madagascar y 3 en las Islas Mascareñas, ubicadas en el Océano Índico al este de Madagascar. Solo 3 especies de *Coffea* tienen importancia económica, ya que constituyen el producto agrícola más importante del comercio mundial: *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica* (León, 2000).

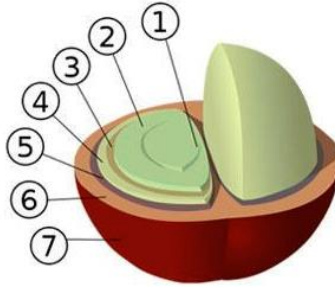


Figura 1.- Partes del fruto de café. 1- Corte central (Embrión). 2- Endospermo (grano de café). 3- Película plateada (tegumento). 4- Endocarpio (pergamino). 5- Capa de pectina (mucílago). 6- Mesocarpio (pulpa). 7- Epicarpio (cascara).

### 2.2.1 *Coffea arabica*

Es actualmente la principal especie del género ya que constituye más del 60% del café que se comercializa en el mercado mundial (Suarez, 2012). Se cultiva principalmente en el centro de Brasil, en las zonas montañosas desde México a Colombia, en las tierras altas de África Oriental y, en menor escala, en áreas montañosas de India, Filipinas e Indonesia (León, 2000). Se considera un café de altura, que se cultiva bien en temperaturas de 18 a 25 °C y a alturas entre los 1200 y los 2000 msnm. (Waller *et al.*, 2007).

Se trata de un arbusto pequeño de hojas que miden en promedio 15 cm de largo por 6 cm de ancho de forma oval o elíptica. Las flores de color blanco o cremoso crecen en las yemas axilares de las hojas, de 2 a 9 en racimos muy cortos. La cereza o baya es elíptica, de aproximadamente 1.5 cm de largo, al principio de color verde, después de color rojo – violeta y con el tiempo azul – negro. Las semillas varían de tamaño, de 8.5 a 12.7 mm de largo, estos granos contienen entre 1.0 y 1.4% de cafeína en base a materia seca y es menos amargo que las otras especies cultivadas (Figura 2). Es el café de mejor calidad en taza (Suarez, 2012).

*Coffea arabica* es autógama y sobre todo endogámica, se puede cruzar con la mayoría de las especies diploides, pero si esto no ocurre, se producirá la autopolinización y autofecundación. Se reconocieron anteriormente dos variedades botánicas que dieron origen a cultivares tradicionales:

- *Coffea arabica* Linn var. *arabica* era el primer tipo original cultivado en Yemen, de donde la mayoría de variedades tienen origen. Históricamente, la



Figura 2.- Partes de *Coffea arabica* L. 1- Flor (sección transversal). 2- Estambres. 3- Pistilo. 4- Ovario y cáliz (sección transversal). 5-Semilla 6-Semilla (sección transversal) 7- Fruto (sección transversal). 8- Sección de la baya mostrando el embrión 9- Embrión.

mayor parte de la producción comercial de café del mundo proviene de esta variedad también llamada “typica”.

- *Coffea arabica* Linn var. *bourbon* surgió como un mutante espontáneo de doble recesión. El árbol es más delgado que la variedad “typica” (Waller *et al.*, 2007).

### 2.2.2 *Coffea canephora*

Comúnmente conocida como café robusta, esta especie se cultiva en África Occidental e Indonesia, y en forma muy reducida en América tropical (León, 2000). Aproximadamente, el 35% del café que se comercializa en el mundo es de esta especie, las zonas bajas tropicales de África permitieron que esta especie desarrollara resistencia a la roya *Hemileia vastatrix* (Suarez, 2012). Ofrece una bebida rica en cafeína; fuerte y más ácido, usualmente usado para la fabricación de café soluble o instantáneo y mezclas (Waller *et al.*, 2007).

### 2.2.3 *Coffea liberica*

La producción de café de Liberia se intensificó a finales del siglo anterior en África y el Sureste de Asia, en parte por su supuesta resistencia a la roya. Sin embargo, el bajo rendimiento, calidad mediocre y el ataque de traqueomicosis redujo

drásticamente su producción (León, 2000). Actualmente contribuye con menos del 1% de la producción mundial. Produce frutos más grandes que las otras dos especies (Figura 3) (Suarez, 2012).



Figura 3.- Comparación de los granos de las tres especies más importantes del género *Coffea*.

### 2.3 Origen y distribución

La especie *Coffea arabica* L. es autóctona de los bosques de Etiopía a altitudes de 1370 – 1830 msnm y en Sudán (Figura 4). La extensión de la zona en la que existe *C. arabica* silvestre es <20,000 km<sup>2</sup>, y con la degradación continua del hábitat, Davis *et al.* (2007) consideran que es vulnerable a la extinción (Waller *et al.*, 2007).

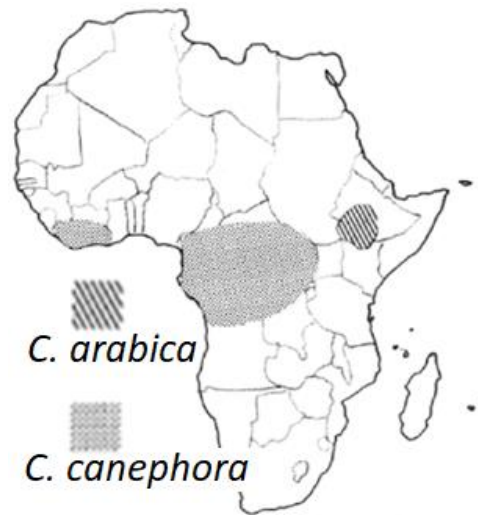


Figura 4.- Mapa de África mostrando los centros autóctonos de la diversidad de *C. arabica* y *C. canephora*.

La propagación a nivel mundial del género de la planta *Coffea* partió del trópico africano. Para 1510 su producción y consumo ya se habían extendido hasta El Cairo (Cinza *et al.*, 2002). A principios del siglo XVII, el café se introdujo en la India y a mediados del siglo XVIII, el consumo de café se extendió por Europa. En América, el café fue introducido durante el siglo XVIII, la planta se propago por el Caribe y el continente (Figura 5). Con la revolución industrial y el crecimiento de la población mundial durante el siglo XX, el café prácticamente se convirtió en una bebida universal (Temis *et al.*, 2011).

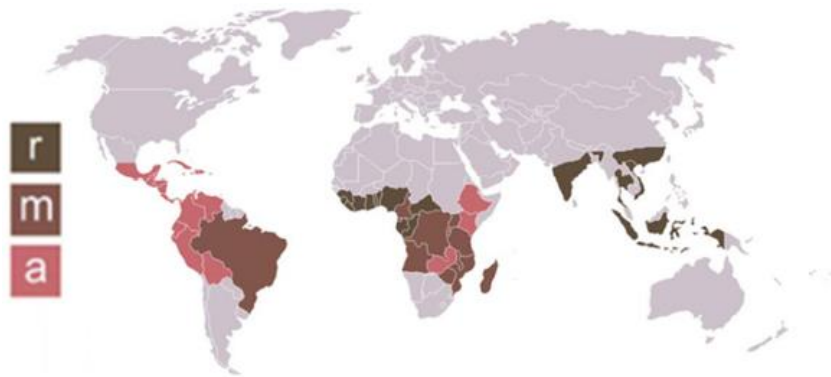


Figura 5.- Mapa de siembra de café de acuerdo a la variedad. r = variedad robusta, m = mezcla de variedad arabica y robusta, a = variedad arabica. Tomado de FAO (2011a).

## 2.4 Producción

El café se produce en América Latina, en África y en Asia, y es una de las materias primas agrícolas más comercializadas en los mercados internacionales. En los años recientes, la oferta mundial del aromático ha sido afectada por factores climatológicos adversos (Rodríguez, 2015).

### 2.4.1 Producción mundial

Entre los ciclos cafetaleros 2004/05 y 2014/15, la producción mundial de café creció a una tasa promedio anual de 1.9 % y reportó su nivel máximo histórico durante el ciclo de cosecha 2012/13. En el ciclo 2013/14 la cosecha global se redujo a 0.4 por ciento, mientras que en 2014/15 disminuyó 5.4 por ciento (Figura 6). Así, la cosecha total de café se ubicó en 146.3 millones de sacos de 60 kg de café verde (Rodríguez, 2015).

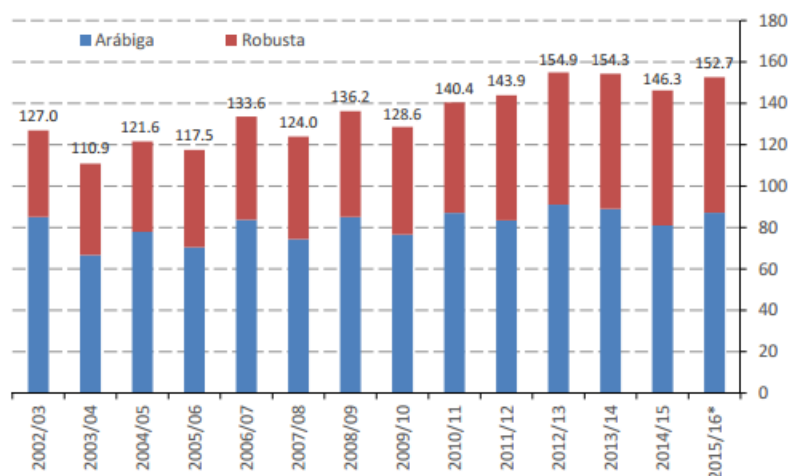


Figura 6.- Producción mundial de café, 2002/03 - 2015/16. Millones de sacos de 60 kg, equivalente en café verde. Tomado de USDA (2016)

En el mercado internacional se distinguen cuatro categorías de café de acuerdo con el tipo de grano. En orden descendente respecto a la calidad y el precio, son: suaves colombianos, granos de arábica producidos principalmente en Colombia; otros suaves, granos de arábica producidos en México y Centroamérica; brasileños naturales, granos de arábica sin lavar, provenientes de Brasil y otros países; y robustas, producidos en África y Asia (Figura 7) (ICO, 2014).

A nivel regional, destaca la producción en Sudamérica. El liderazgo en la producción cafetalera de esta región se asocia principalmente con las condiciones de suelo, clima y altitud, altamente favorables para el cultivo del café en Brasil, Colombia, Perú y Ecuador (Figura 7) (Rodríguez, 2015).

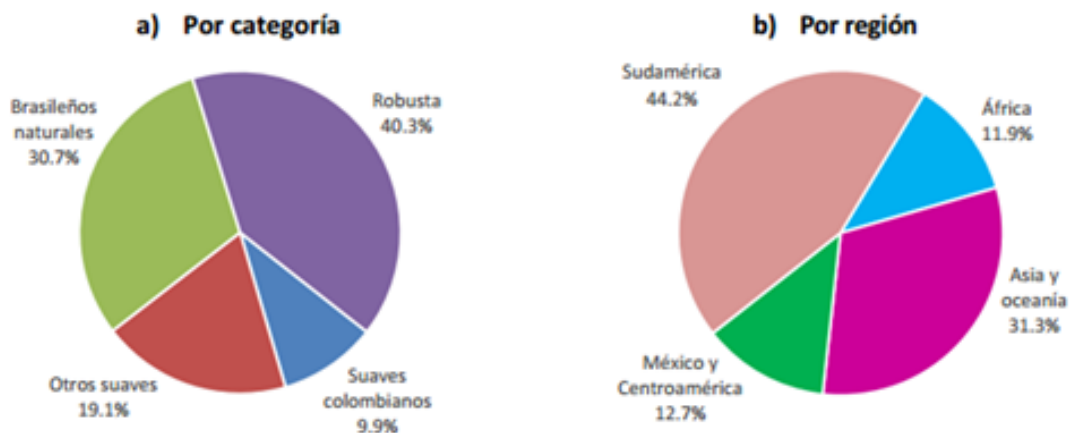


Figura 7.- Producción mundial de café, 2014/2015. Tomado de ICO (2016).

#### 2.4.2 Producción nacional

La introducción del cultivo en México ocurrió hace 200 años (Cano *et al.*, 2005). A nivel mundial, México es el sexto productor de café arábica con una participación del 3.8 por ciento (Rodríguez, 2015) y es el primer productor mundial de café orgánico, y uno de los primeros en cafés “Gourmet” (Cinza *et al.*, 2002).

La producción de café en México se realiza en una superficie equivalente al 3.3 por ciento del área total sembrada en México. Esta cadena productiva es una de las más importantes en el sector agroindustrial del país y destaca por el número de productores que incorpora (504,372) y el número de empleos que genera (Rodríguez, 2015). En el ciclo cafetalero 2014/15 se cosecharon 666,375 hectáreas,

de las cuales el 90.3 por ciento se concentró en cinco entidades: Chiapas (37.2 por ciento), Veracruz (20.3 por ciento), Oaxaca (17.6 por ciento), Puebla (8.9 por ciento) y Guerrero (6.3 por ciento).

La producción de café cereza se ubicó en 1.04 millones de toneladas en el ciclo 2014/15, volumen que significa una reducción de 11 % con respecto a la cosecha del ciclo previo y su nivel más bajo desde 1979/80, ciclo a partir del cual se tiene registro. Aproximadamente el 95% de la producción de café se obtiene de la especie arábica y el 5% corresponde a variedad robusta (Rodríguez, 2015). En 2014/15 se produjo café en 16 entidades; en cinco de estas se concentró el 93.6% de la oferta nacional: Chiapas (36.9%), Veracruz (26.9%), Puebla (17.5%), Oaxaca (8.0%) y Guerrero (4.4%) (Figura 8).

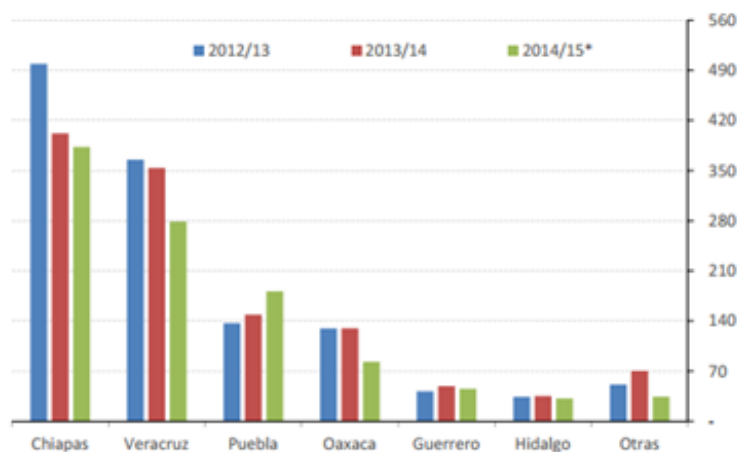


Figura 8.- Principales estados productores de café cereza en México. 2012/13 - 2014/15, en miles de toneladas,. Tomado de SIAP-SAGARPA (2015)

### 2.4.3 Producción en Chiapas

En el ciclo 2014/15, Chiapas concentró el 36.9 % de la oferta nacional de café cereza, posicionándolo como la mayor entidad productora del país, le siguen Veracruz, Puebla, Oaxaca y Guerrero. En diez municipios de Chiapas (Motozintla, Siltepec, Tapachula, Chilón, Simojovel, Amatenango de la Frontera, La Concordia, Tila, Bella Vista y Ángel Albino Corzo) se concentró el 46.1 % de la producción de esa entidad en 2014/15 (SIAP-SAGARPA, 2015).

Durante los últimos 10 años, la producción de café cereza en Chiapas disminuyó a una tasa promedio anual de 5.0%. Esta disminución se debe a que, en 2012, la

entrada de la roya a México con un nivel más severo, afectó de manera contundente la producción del estado. A pesar de esto, en Chiapas, las expectativas de cosecha son favorables, ya que, desde 2012, la presencia de la roya en el área del Soconusco motivo el inicio de un programa de renovación de cafetales, por lo que en el ciclo 2015/2016 ya se tienen plantaciones tolerantes a la roya que están iniciando producción (Rodríguez, 2015).

## **2.5 Proceso**

El proceso de la caficultura empieza con la siembra de cafetos, la producción del café se inicia entre los dos y tres años después del establecimiento del cafetal, la productividad depende de factores como la variedad empleada, las condiciones ecológicas de la zona de cultivo y el manejo agronómico (Duicela *et al.*, 2004).

### **2.5.1 Recolección del fruto**

La época de cosecha puede variar, en función del inicio de las lluvias que inciden directamente en la floración y fructificación de los cafetales (Duicela *et al.*, 2004), en México la cosecha se realiza entre septiembre y marzo.

Existen cuatro sistemas: 1) cosecha selectiva en varias etapas, se arrancan los racimos cuando contienen cerezas maduras; 2) cosecha única, los trabajadores cosechan todo a su paso; 3) cosecha mecánica con maquinaria, desprende el fruto del árbol mediante vibración; 4) cosecha selectiva en varias etapas de manera manual, se recogen solo las cerezas maduras (Temis *et al.*, 2011).

La recolección selectiva de cerezas maduras evidentemente eleva al máximo la cantidad de café maduro que se cosecha, ya que los granos, que todavía no están maduros se dejan en el árbol para madurar, y las cerezas que se han pasado de madurez se evitan, es la parte más costosa de la producción de café, suelen necesitarse entre 5 y 10 “pasadas” en una cosecha (FAO, 2011a).

### **2.5.2 Beneficio húmedo**

El beneficiado es el tratamiento del café cosechado hasta producir granos secos y estables, es decir, la transformación del fruto maduro de la planta de café conocido como cereza para obtener café verde o pergamino (Temis *et al.*, 2011). Los frutos



maduros de café pueden ser procesados por tres métodos para la obtención de los granos verdes (Duicela *et al.*, 2004). Los diferentes tipos de procesamiento producen bebidas con gustos y aromas que el consumidor puede seleccionar de acuerdo a sus preferencias. El café de mejor calidad, y por lo general de costo elevado, son los de la especie arábica preparados por el beneficio húmedo y se les conoce como cafés suaves. Poseen un sabor fino, aromático y con cuerpo, es por ello que el beneficio húmedo es el más utilizado por los caficultores (Marques *et al.*, 2010).

### 2.5.2.1 Despulpado

Una vez cosechados los frutos maduros, se realiza la eliminación de la pulpa (pericarpio), esta operación mecánica se efectúa usando máquinas despulpadoras (Figura 9) que aprovechan la cualidad lubricante del mucílago del fruto, para que por presión y fricción se separen los granos y la pulpa (Wintgens, 2004). Esta operación debe realizarse el mismo día de la cosecha. El café despulpado se conoce como “café baba”, que pasa inmediatamente a recipientes apropiados para su fermentación (Temis *et al.*, 2011).

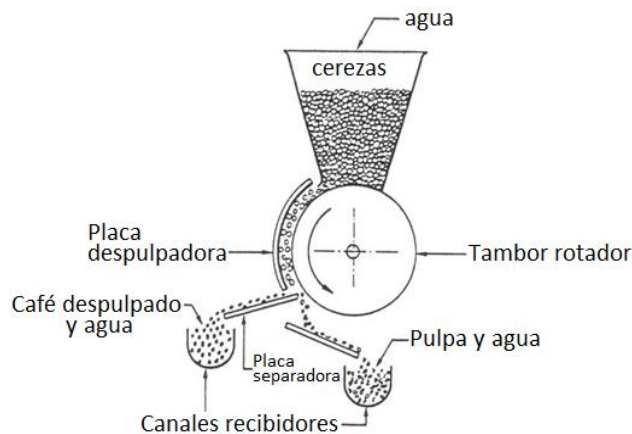


Figura 9.- Despulpadora tipo tambor horizontal. Tomado de Wintgens, 2004.

### 2.5.2.2 Fermentación

La fermentación del café tiene el propósito de remover el mucilago adherido al pergamino. Para proceder a la fermentación, se coloca el “café baba”, sin agregar agua, en un recipiente apropiado como los tanques de fermentación. La fermentación requiere de 12 a 20 horas, variando según la temperatura de la zona de producción (Duicela *et al.*, 2004).

Durante la fermentación se presentan cambios en la humedad del mucilago de café, que son mayores en cuanto mayor es la temperatura ambiente durante el proceso. La materia seca del mucilago de café está conformada por proteínas, lípidos, carbohidratos, entre otros (Figura 10), los cuales son oxidados, hidrolizados y consumidos en su mayoría por levaduras y bacterias lácticas que se encuentran en el café despulpado, produciendo energía (ATP), etanol, ácido láctico y dióxido de carbono, además se obtiene otros alcoholes, ácidos como el succínico, fórmico y sustancias olorosas como aldehídos, cetonas y ésteres (Puerta, 2012).

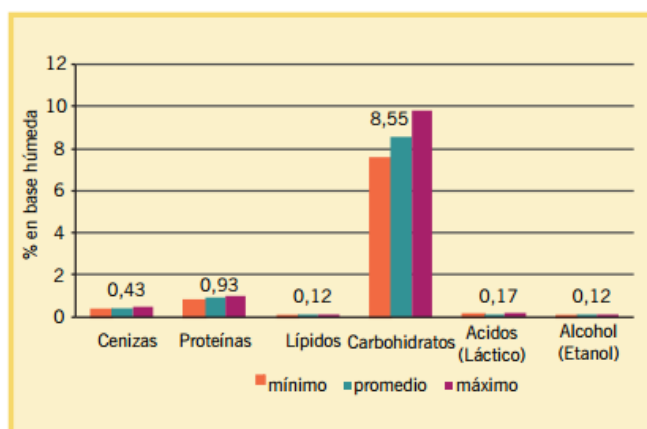


Figura 10.- Composición de la materia seca del mucilago de café (Porcentaje en base húmeda). Tomado de Puerta, 2012.

### 2.5.2.3 Lavado

El lavado del café se realiza para eliminar el mucílago del pergamino, inmediatamente después de constatarse el punto óptimo de fermentación. Para efectuar un buen lavado se debe usar agua limpia, restregando fuertemente el café fermentado y cambiando el agua las veces que sean necesarias, hasta que el pergamino quede completamente limpio (Duicela *et al.*, 2004).

### 2.5.2.4 Secado

El secado del café se efectúa para eliminar el agua adherida al pergamino y reducir la humedad hasta llegar a 12.5%. El tiempo de secado que requiere el café pergamino es de 40 a 50 horas de sol, aproximadamente. Se debe evitar el rehumedecimiento de los granos porque altera su color, crea condiciones para el ataque de hongos causantes de la Ochratoxina A (OTA), deteriora la calidad organoléptica de la bebida y pone en riesgo la salud de los consumidores (Duicela

*et al.*, 2004). El resultado es el llamado “Café Pergamino”, y es de esta forma en la que se almacena en sacos de 60 kg, hasta el momento de su exportación o preparación para el consumo (Puerta, 2012).

### 2.5.3 Trillado

El trillado del café consiste en separar o descascarillar el grano del pergamino. Hay diferentes aparatos diseñados para esta tarea, muchos basados en fricción por medio de tambores, discos, rotores y cuchillas, pero todos cumplen la misma función: decorticar el grano. Dependiendo del tipo de grano y su humedad se utilizan diferentes aparatos (Duicela *et al.*, 2004).

### 2.5.4 Torrefacción

La torrefacción es la operación en la cual son formados, bajo la acción del calor, los principios aromáticos que no existen previamente en la semilla del café. Consiste en calentar los granos a una temperatura que provoque modificaciones físico-químicas que hace que de éstos se pueda obtener una infusión cuyas cualidades sean satisfactorias, estas cualidades dependen del grado de tueste (Figura 12). En este proceso el calor tiene que ser aplicado rápida y uniformemente manteniendo los granos en movimiento (Puerta, 2012).



Figura 11.- Niveles de tueste del grano. Rubio, canela, medio, ropa de monje, marrón, marrón oscuro, francés (seminegro), italiano (negro).

## 2.6 Residuos

El beneficio húmedo es el método más utilizado para el tratamiento post-cosecha, en esta vía se generan residuos líquidos (mucílago, agua de lavado y despulpe) y sólidos (pulpa de café) (Terry *et al.*, 2005). El procesamiento de 100 kg de frutos de café maduros genera aproximadamente 10% de café oro y el 90% restante está formado por subproductos (Tabla 2), como pulpa fresca (40%), mucílago (20%), agua (17%), pergamino y película plateada (3%), entre otros (Noriega *et al.*, 2009).

La pulpa constituye el residuo más abundante del proceso. Cuando no se utiliza adecuadamente genera la mayor fuente de contaminación ambiental en las zonas

cafetaleras, esto debido a su alto contenido de material orgánico que provoca un aumento considerable en los niveles de contaminación en los cuerpos receptores (Terry *et al.*, 2005). En el estado de Chiapas se produjeron aproximadamente 167,319 toneladas de pulpa de café en el ciclo 2014/15 y solo un pequeño porcentaje de los productores dispone de este residuo de una manera adecuada, la gran mayoría desecha la pulpa en zonas destinadas a tal fin, convirtiéndose en fuente de contaminación de los recursos naturales.

Tabla 2.- Residuos obtenidos en el proceso de beneficio e industrialización de 100 kg de café cereza. Tomado de Suarez, 2012.

Proceso	Residuo obtenido	Pérdida en kg
Despulpado	Pulpa fresca	43.6
Lavado	Mucílago	14.9
Secado	Agua	17.1
Trillado	Pergamino y película plateada	4.2
Torrefacción	Volátiles	2.2
Preparación de la bebida	Borra	10.4
Pérdida total	Residuos	92.4

### 2.6.1 Usos alternativos

Ante esta realidad se han realizado muchos estudios para aprovechar la pulpa de café y disminuir su efecto tóxico en el ambiente. Dentro de esas alternativas destacan el ensilaje destinado a la alimentación animal (Noriega *et al.*, 2009), la pulpa como fuente alternativa de antioxidantes (Días, 2011), como fuente de cuatro clases principales de polifenoles (flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y antocianidinas) (Ramírez-Coronel *et al.*, 2004), la producción de biogás y lodos de digestión que son factibles para ser usados como bioabonos y alimento animal (Terry *et al.*, 2005), el compostaje o lombricompostaje para fertilización de los cultivos (Blandón *et al.*, 2009), entre otros.

## 2.7 Caracterización de la pulpa de *C. arabica*

Conocer las características de la pulpa de café permite aplicar estrategias de manejo de dichos residuos, que estén al alcance de los productores, para mitigar el impacto al medio ambiente.

### **2.7.1 Caracterización físico – química**

Algunos estudios realizados en relación a las características físicas y químicas han indicado su uso potencial en la alimentación animal. A través de tales investigaciones se ha podido establecer que la pulpa de café posee factores anti-nutricionales que limitan su uso en la alimentación animal (Molina *et al.*, 1990). Se ha podido establecer que dentro de tales factores los más nocivos son cafeína, polifenoles, taninos y el alto contenido de fibra de la pulpa. Consecuentemente, se han investigado alternativas para detoxificar este material. Noriega *et al.* (2009) señalaron que a los 120 días de ensilaje de pulpa de café se registraron valores muy bajos de taninos, lo que le proporcionan alto valor nutricional. Otra alternativa para disminuir la concentración de factores anti-nutricionales es el proceso de fermentación sólida usando *Aspergillus niger*. A través de este proceso se ha podido reducir los niveles de cafeína, polifenoles y fibra de la pulpa.

### **2.7.2 Caracterización microbiológica**

Debido a la compleja naturaleza de la pulpa de café en estado de fermentación, la caracterización microbiológica presenta muchas dificultades. Los microorganismos de muestras tan dinámicas suelen ser incultivables y es por ello que se utilizan técnicas moleculares. La obtención de ADN de calidad adecuada y en cantidades suficientes es una etapa crítica del análisis de las comunidades microbianas, estos métodos son susceptibles a contaminantes tales como ácidos húmicos, metales y xenobióticos que interfieren con el proceso de extracción (He *et al.*, 2009), además de los metabolitos secundarios que los mismos microorganismos producen como ácidos grasos, alcoholes y cetonas. Guillén *et al.* (2015) compararon 3 métodos de laboratorio y 2 kits para extracción de DNA de muestras ambientales complejas, entre ellas la pulpa de café en descomposición. El método de extracción que presentó mejores resultados fue el método de Lisozima, aunque con aproximadamente 10% de impurezas, esto impidió realizar la técnica de PCR para la identificación de los microorganismos.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Anualmente se produce una cantidad considerable de materia orgánica representada por material vegetal en los diversos procesos de la producción agrícola, pero sólo una cierta parte de esta producción es aprovechada directamente para la alimentación humana y animal, dejando a la deriva una gran cantidad de mal llamados desechos, los cuales se convierten en un potencial de contaminación ambiental. El producto agrícola más importante en el mundo es el café, generando sólo en México, alrededor de 450 mil toneladas al año de residuos sólidos, de los cuales 167 mil se generan en Chiapas. Estos residuos terminan en áreas de bosque o en cuencas hidrográficas, lo que supone un grave problema ambiental, ya que la mayoría de los productores no cuentan o no conocen alternativas de manejo para poder dar un uso apropiado a estos residuos.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

La pulpa de café en estado de descomposición es de mucha importancia, hay que recordar que estos residuos son responsables de la contaminación en zonas cafetaleras, principalmente de suelos y ríos. En México se ha estudiado poco sobre el tema y no existen estudios realizados en la zona de la Frailesca en Chiapas, segunda región productora de café en el estado, después de El Soconusco. Dada la necesidad de resolver la problemática se ha propuesto estudiar las características físico-químicas de estos residuos para conocer el valor nutricional, además de realizar la estandarización de una técnica de extracción que nos permita obtener DNA de buena calidad y en cantidad suficiente para la caracterización de comunidades microbianas presentes, ya que no existe una técnica de extracción de DNA específica para las muestras de estudio debido a su compleja naturaleza. Todo esto con la intención de generar conocimientos para proponer estrategias de manejo o usos alternativos, que estén al alcance de los productores para mitigar el impacto al medio ambiente.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Analizar la composición física, química y microbiológica de los residuos sólidos en proceso de degradación derivados del beneficio húmedo de *Coffea arabica* en La Concordia, Chiapas.

### **5.2 Específicos**

- Determinar las características físicas y químicas de los residuos sólidos generados durante el beneficio húmedo de café en La Concordia, Chiapas.
- Estandarizar el método de extracción de ADN para muestras de pulpa de café en proceso de degradación.
- Identificar grupos microbianos de los residuos sólidos por medio de la técnica de PCR en tiempo real.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Sitio de muestreo

Las muestras de residuos sólidos fueron colectadas en la región de los Cuxtepeques (15°45'52.8"N, 92°58'03.4"W) perteneciente a la Unión Ramal Santa Cruz S.P.R. de R.I. localizada en el municipio de La Concordia en Chiapas, México en el mes de Enero de 2017. Para cada muestra se tomaron aproximadamente 1000 g de pulpa e inmediatamente se almacenaron en una hielera para detener el proceso de descomposición natural.

Tabla 3- Descripción de las muestras.

Número de muestra	Especie	Altitud del cultivo	Tiempo de degradación (semanas)
0	<i>Coffea arabica</i>	1600 msnm	0
1			1
2			2
3			3
4			4

### 6.2 Localización del área de estudio

Los análisis para la caracterización físico-química y microbiológica de las muestras se llevaron a cabo en los laboratorios de Bromatología y Genética respectivamente, dentro de las instalaciones de los Laboratorios Institucionales en el edificio C ubicado en El Colegio de la Frontera Sur unidad San Cristóbal, estos análisis fueron financiados por dicha institución.

### 6.3 Análisis bromatológicos

Para la caracterización físico-química de los residuos sólidos se realizó un AQP, la determinación de un factor anti nutricional y energía calorífica. Las pruebas se realizaron por duplicado.

#### 6.3.1 Pre tratamiento de la muestra

Las muestras se ingresaron en estufas a una temperatura de 55°C para su deshidratación durante 4 días, los dos primeros días moviendo la muestra con regularidad para favorecer el secado y evitar cualquier alteración debido al



desarrollo de procesos enzimáticos que afecten el contenido nutricional. Luego se pasaron por un molino de cuchillas marca THOMAS-Wiley®, se tamizaron en malla de 1mm y se almacenaron en frascos de plástico con tapa hermética.

### 6.3.2 Humedad

Las muestras se deshidrataron en una estufa marca Binder® a 100°C por un periodo de 4 h.

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{\left( \text{Peso del crisol con} \right)_{\text{muestra húmeda}} - \left( \text{Peso del crisol con} \right)_{\text{muestra seca}}}{\text{Peso de la muestra húmeda}} \times 100$$

### 6.3.3 Cenizas

Siguiendo la NMX-F-607-NORMEX-2013 se realizó la determinación de cenizas en las siguientes condiciones. Las muestras se carbonizaron en una parrilla eléctrica para luego calcinarlas en una mufla marca Felisa® a 550°C durante 6 h.

$$g \text{ Cenizas} / 100g \text{ de muestra} = \left( \frac{C - A}{B} \right) \times 100$$

Dónde: A = peso en gramos del crisol vacío; B = peso en gramos de la muestra;  
C= peso en gramos del crisol con ceniza.

### 6.3.4 Grasas

Para la determinación de extracto etéreo en alimentos se siguió la NMX-F-615-NORMEX-2004 basándose en el método Soxhlet. Para la extracción se utilizó éter de petróleo como disolvente con ciclos de recirculación de aproximadamente 35 min, la extracción se efectuó durante 7 h. Los matraces se secaron a una temperatura de 100°C durante 2 horas en un horno marca Binder®.

$$\% \text{ extracto etereo} = \frac{(c - d) - a}{b} \times 100$$

Donde:

a = peso constante del matraz de ebullición; b = peso de la muestra; c = peso del matraz con grasa; d = peso del matraz del blanco.

### 6.3.5 Proteína cruda

Para el desarrollo de esta metodología se siguió la NMX-F-608-NORMEX-2011 para la determinación de proteínas en alimentos con el método Kjeldahl. La digestión de las muestras se realizó con 1.5 g de mezcla catalizadora y 5 mL de ácido concentrado en un block digestor a 380°C durante 100 min. A las muestras digeridas se les agregó agua destilada tipo II y 20 mL de solución de hidróxido de sodio 10N. La destilación fue con ácido bórico al 1% con mezcla de indicadores rojo de metilo y verde de bromocresol, por último, la titulación se llevó a cabo con ácido sulfúrico 0.0506 N valorado.

$$\% \text{ Nitrogeno} = \frac{(Va - Vb \times N \times 0.014)}{P} \times 100$$

$$g \text{ Proteína} / 100 g \text{ de muestra} = \% \text{ Nitrogeno} \times FTP$$

Dónde:

Va=volumen de ácido sulfúrico (mL) gastados en la titulación de la muestra.

Vb = Volumen de ácido sulfúrico (mL) gastados en la titulación del blanco.

N = Normalidad del ácido sulfúrico valorado.

P = Peso de la muestra en gramos.

0.014 = Mili equivalentes del nitrógeno.

FTP = Factor de Transformación a Proteína Cruda. 6.25

### 6.3.6 Fibra cruda

El análisis de Fibra cruda se realizó en un digestor/analizador ANKOM® 200/220 siguiendo la metodología de este equipo. Las muestras se colocaron en bolsas para análisis marca ANKOM® F57 y se sellaron con el equipo marca ANKOM® 1915. La digestión se realizó con ácido sulfúrico 0.255 N durante 30 min a 100°C en agitación y después con hidróxido de sodio 0.313 N en las mismas condiciones. El secado se llevó a cabo en una estufa marca Binder® a 100°C durante 2 h y la incineración en una mufla marca Felisa® a 550°C por 6 h.

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{[(Ps - Pv) - (Pcp - Pc)] - (Pb - Pc)}{M} \times 100$$

Dónde:

*Ps* = peso seco de la muestra más el peso de la bolsa para análisis.

*Pv* = peso de la bolsa para análisis vacía.

*Pcp* = peso de cenizas de la muestra más el peso del crisol.

*Pc* = peso constante del crisol.

*Pb* = peso de cenizas del blanco más el peso del crisol.

*M* = peso de la muestra

### 6.3.7 Azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores totales se realizó por la técnica de DNS. Se agregó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.5 M a las muestras para hidrolizar los polisacáridos, se incubaron en baño maría en ebullición por 20 min con agitación ocasional. Pasado el tiempo se adicionó NaOH al 10%. La preparación de la curva de calibración se realizó a partir de una solución de glucosa a una concentración de 15 mg/mL y se prepararon las diluciones como se muestra en la tabla 4. Para la oxidación de los azucares reductores totales, a un tubo de ensayo se agregó 1 mL de la solución problema, 2 mL de agua destilada y 1 mL del reactivo DNS, para el blanco se utilizó agua destilada como solución problema. Durante 15 min se colocaron en un baño maría en ebullición y se enfriaron con hielo para posteriormente agregar 16 mL de agua destilada. Todas las muestras se leyeron a 540 nm.

Tabla 4.- Preparación de la curva de calibración utilizando glucosa como estándar.

Punto de curva	Volumen de solución madre (mL)	Concentración (mg/mL)	Aforo
Blanco	0	0	25 mL
1	1.5	0.9	
2	2.0	1.2	
3	2.5	1.5	
4	3.0	1.8	
5	3.5	2.1	

### 6.3.8 Carbohidratos

Para la obtención de este factor se aplicó la siguiente fórmula.

$$C = 100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Proteína cruda} + \% \text{ Grasa} + \% \text{ Fibra cruda})$$

### 6.3.9 Taninos condensables

La extracción se realizó con metanol absoluto en agitación durante 20 min. La preparación de la curva de calibración se realizó a partir de una solución de catequina a una concentración de 5 mg/mL y se prepararon las diluciones como se muestra en la tabla 5. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV – Vis a una longitud de onda de 500 nm.

Tabla 5.- Preparación de la curva de calibración utilizando catequina como estándar.

Punto de curva	Volumen de solución madre (mL)	Concentración (mg/L)	Aforo
Blanco	0	0	50 mL
1	2	200	
2	4	400	
3	6	600	
4	8	800	
5	10	1000	

### 6.3.10 Energía calorífica

La determinación de este factor se llevó a cabo en un calorímetro de bomba de oxígeno marca Parr Instrument® modelo 1341 y se siguieron las instrucciones de operación de este equipo. Se elaboraron tabletas circulares de las muestras en una prensa de comprimidos marca Parr Instrument® modelo 2811, para esto se pesó la muestra y se agregaron 3 gotas de agua destilada con el fin de lograr una mayor compactación, siempre procurando de que la pastilla no pesara más de un gramo. La pastilla se colocó en el crisol de acero inoxidable, se cortaron 10 cm de alambre de ignición y se amarró firmemente a los electrodos de la bomba de oxígeno como se muestra en la figura 13, asegurándose que el alambre toque la muestra, se cerró la bomba y se presurizó con oxígeno a 35 atm. La bomba de oxígeno se introdujo a la cubeta oval que a su vez se encontraba dentro de la camisa adiabática, luego se

agregaron 1400 mL de agua a la cubeta oval, tratando de que la temperatura estuviera entre 19 y 23 °C, por último se colocó la tapa del calorímetro. Una vez instalado el equipo, se encendió el agitador para alcanzar el equilibrio térmico entre los componentes del sistema, logrado esto se registró la temperatura a los 0, 5 y 10 min, en el minuto 10 se presionó el interruptor para accionar la ignición y se registraron las temperaturas del minuto 10 al minuto 26 en intervalos de 30 segundos. Se desmontó el calorímetro con cuidado y con una piseta se agregaron aproximadamente 50 mL de naranja de metilo al interior de la bomba de oxígeno a modo de lavado, estos residuos se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL para ser titulado con NaOH.

$$\frac{\text{cal}}{\text{g}} = \frac{[(\text{Temperatura} \times 1876) - (1400 \times P_{\text{neto}}) - (1.38 \times \text{mL NaOH})]}{P_m}$$

Donde:

$$\text{Temperatura} = (T_{\text{max}} - T_{10\text{min}}) - [V_1 \times (b - a)] - [V_2 \times (c - b)]$$

**V<sub>1</sub>**= Velocidad a la cual la Temperatura fue incrementando en los primeros 5 min antes de la ignición:  $V_1 = \frac{T_{5\text{min}} - T_{10\text{min}}}{5}$

**V<sub>2</sub>**= Velocidad a la cual la Temperatura fue incrementando en los 5 min después de la ignición:  $V_2 = \frac{T_{\text{max}} - T_{\text{final}}}{5}$

**a** = tiempo de ignición (10min).

**b** = tiempo cuando el incremento de la temperatura corresponde al 60% del total:

$$b = [(T_{\text{max}} - T_{10\text{min}}) \times 0.6] + T_{10\text{min}}$$

**c** = tiempo anterior a la temperatura constante.

**P<sub>neto</sub>**= peso consumido del alambre:  $P_{\text{neto}} = P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}}$

**T<sub>max</sub>**= Temperatura máxima alcanzada.

**T<sub>10min</sub>**= Temperatura registrada a los 10 min.

**P<sub>m</sub>**= Peso de la muestra.

**mL NaOH**= mililitros de NaOH gastados en la titulación.

**1400**= mililitros de agua utilizados.

**1876**= energía equivalente del calorímetro determinada por estandarización.

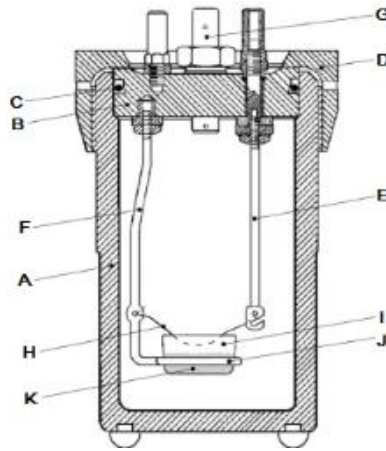


Figura 12.- Diseño esquemático de la bomba de oxígeno. A. Cuerpo de la bomba; B. Cabeza de la bomba; C. Anillo viton; D. Tapa roscada; E. Electrodo aislado de la cabeza de la bomba; F. Soporte del electrodo unido a la cabeza de la bomba; G. Válvula de entrada del oxígeno; H. Alambre de ignición; I. Crisol de acero inoxidable; J. Soporte del crisol; K. Muestra. Tomada de Santos, 2010.

### 6.3.11 Análisis de resultados

Los resultados obtenidos se analizaron a partir de cinco tratamientos que representaron los diferentes tiempos de descomposición de la pulpa de café y dos repeticiones. Los valores de las variables cuantificadas a las 0, 1, 2, 3 y 4 semanas se analizaron estadísticamente por medio de Análisis de Varianza Simple y las comparaciones de los valores promedios se realizó por la prueba de diferencia mínima significativa al 5% de probabilidad en el software Statgraphics Centurion®.

## 6.4 Extracción de DNA

Debido a la alta complejidad de las muestras, se realizaron tratamientos previos para eliminar contaminantes que puedan afectar la obtención de un DNA de buena calidad. Todos los materiales utilizados fueron esterilizados por calor húmedo a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 min.

### 6.4.1 Pretratamiento de las muestras

El pretratamiento de las muestras consistió en la eliminación de ácidos grasos volátiles y en lavados con buffer de fosfatos.

#### **6.4.1.1 Extracción de ácidos grasos volátiles (AGV's)**

Se empleó la técnica de Folch, esta técnica se basa en la propiedad de los disolventes orgánicos, como el cloroformo, para solubilizar los ácidos grasos. La metodología se tomó de Ayala *et al.* (2008) quienes la aplican para la extracción de grasas en frío de carne de bovino y se modificó para extraer los ácidos grasos volátiles de las muestras de estudio.

Se pesaron aproximadamente 20 mg de muestra, a las cuales se les agregó 1 mL de reactivo de Folch (Cloroformo/metanol 2:1), se agitaron en vortex por 1 min y luego se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se lavó una vez más.

#### **6.4.1.2 Lavado con buffer de fosfatos**

De acuerdo con LaMontagne *et al.* (2002) los lavados con buffer de fosfatos ayudan a reducir el DNA extracelular y los contaminantes orgánicos solubles. Es por ello que Yang *et al.* (2007) realiza estos lavados para muestras de compost, este método fue modificado para las muestras de estudio.

A las muestras pretratadas con métodos de extracción de AGV's se les agregó 1 mL de buffer de fosfatos (pH 7.4) y se mezclaron en vortex durante 5 min para luego centrifugar a 8,000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C, el sobrenadante se desechó y las muestras fueron lavadas una vez más.

#### **6.4.2 Método CTAB 2X**

Este método de extracción de DNA se tomó de Doyle & Doyle (1987) para muestras vegetales (hojas y corteza) y fue modificado para las muestras de pulpa de *Coffea arabica* en descomposición.

1 mL de solución CTAB 2X (2% w/v) fue agregado a la muestra pretratada, se mezcló en agitador tipo vortex durante 20 s para luego incubar por 30 min a 65°C agitando las muestras cada 3 min. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 3 µL de mercaptoetanol, se agitó en vortex por 20 s y se incubó a 65°C toda la noche. Posteriormente se agregaron 400 µL de acetato de amonio frío (7.5 m L<sup>-1</sup>; pH 5) y se centrifugó a 13,000 rpm durante 8 min.

El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se agregó un volumen de cloroformo/octanol (24:1) frío y se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se repitió el lavado una vez más. El sobrenadante se transfirió a tubos que contenían 700 µL de etanol frío al 96%, se agitó suavemente con la mano y se incubó a -20°C toda la noche.

Luego de la incubación en frío, se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 8 min y se eliminó el sobrenadante por decantación, se centrifugó a 13,000 rpm durante 8 minutos después de haber agregado al pellet 300 µL de etanol frío al 80%, se eliminó el sobrenadante por decantación y se centrifugó en un concentrador de DNA por 6 min a temperatura ambiente, luego se hidrataron las muestras con 40 µL de agua libre de nucleasas y se almacenaron a -20°C.

#### **6.4.3 Electroforesis**

Se verificó la presencia de DNA y la calidad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X añadiendo 4 µL de muestra y 2 µL de Azul de Bromofenol 6X. Las condiciones de corrimiento fueron a 80 V durante 50 min, pasado este tiempo, el gel se incubó en una solución de bromuro de etidio por 15 min para luego ser observado en un transiluminador UV Kodak®.

#### **6.4.4 Cuantificación de DNA**

Se continuó con la cuantificación y verificación de la calidad del DNA en un espectrofotómetro marca NanoDrop® 2000c de Thermo Scientific, con una alícuota de 1 µL utilizando como blanco 1 µL de agua estéril libre de nucleasas. Considerando calidad aceptable una relación A260/A280 de entre 1.6 a 2.0.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización físico-química

Los resultados obtenidos en esta etapa se observan en la tabla 6. Estos análisis revelan un importante valor nutricional para la pulpa de café a las 4 semanas de descomposición.

*Tabla 6.- Análisis físico - químico de la pulpa de café en diferentes tiempos de descomposición. Los resultados expresados son las medias obtenidas de cada muestra. a, b, c, d, letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).*

Determinación	Tiempo de descomposición (semanas)				
	0	1	2	3	4
<b>Humedad (%)</b>	4.79 <sup>c</sup> ±0.963	3.05 <sup>a</sup> ±0.101	5.24 <sup>c</sup> ±0.333	3.42 <sup>ab</sup> ±0.242	4.59 <sup>bc</sup> ±0.145
<b>Cenizas (%)</b>	8.17 <sup>a</sup> ±0.018	10.16 <sup>b</sup> ±0.006	10.69 <sup>bc</sup> ±0.011	11.13 <sup>c</sup> ±0.044	20.55 <sup>d</sup> ±0.499
<b>Grasa (%)</b>	1.18 <sup>ab</sup> ±0.095	1.65 <sup>d</sup> ±0.054	1.60 <sup>cd</sup> ±0.077	1.41 <sup>bc</sup> ±0.037	1.16 <sup>a</sup> ±0.152
<b>Proteína cruda (%)</b>	9.72 <sup>a</sup> ±0.0	12.53 <sup>b</sup> ±0.017	13.35 <sup>c</sup> ±0.342	12.26 <sup>b</sup> ±0.313	15.89 <sup>d</sup> ±0.062
<b>Fibra cruda (%)</b>	12.54 <sup>a</sup> ±0.614	16.53 <sup>b</sup> ±0.019	19.28 <sup>d</sup> ±0.441	18.34 <sup>c</sup> ±0.218	23.72 <sup>e</sup> ±0.130
<b>Azúcares reductores (%)</b>	52.82 <sup>d</sup> ±0.752	36.61 <sup>c</sup> ±0.656	36.48 <sup>c</sup> ±0.604	29.17 <sup>b</sup> ±0.853	23.89 <sup>a</sup> ±0.973
<b>Carbohidratos (%)</b>	63.41 <sup>e</sup> ±0.638	56.02 <sup>d</sup> ±0.070	49.82 <sup>b</sup> ±0.374	53.74 <sup>c</sup> ±0.935	34.11 <sup>a</sup> ±0.267
<b>Taninos condensables (%)</b>	0.56 <sup>d</sup> ±0.008	0.73 <sup>e</sup> ±0.0	0.18 <sup>a</sup> ±0.008	0.26 <sup>c</sup> ±0.008	0.23 <sup>b</sup> ±0.0
<b>Energía calorífica (cal/g)</b>	4117.55 <sup>b</sup> ±91.55	4100.53 <sup>b</sup> ±119.41	3897.61 <sup>ab</sup> ±68.64	3982.61 <sup>ab</sup> ±125.25	3787.19 <sup>a</sup> ±11.63

#### 7.1.1 Humedad

Debido a que el área donde se disponen los residuos sólidos no está protegida de las lluvias ni se tiene un control sobre la humedad, este factor presenta muchas fluctuaciones conforme pasa el tiempo y no presenta tendencia definida de aumento o disminución en relación al tiempo de degradación. Presentó un valor promedio

entre los 5 muestreos de 4.22%, siendo 5.25% el más alto en la semana 2 con una diferencia significativa con el valor más bajo en la semana 1 con un porcentaje del 3.05%. Los valores restantes no tuvieron diferencia mínima significativa.

### 7.1.2 Cenizas

En promedio, el contenido de cenizas se incrementó a medida que aumentó el tiempo de descomposición como se puede observar en la Figura 14, este incremento concuerda con lo reportado por Noriega *et al.* (2009) quienes evaluaron el contenido de cenizas en pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje, aunque presentan valores menores para esta determinación, obteniendo 12.46% a los 90 días, comparado con los 20.54% obtenidos a los 28 días, quienes también reportaron porcentajes por debajo de los 15% fueron Braham y Bressani (1978) y Ferrer *et al.* (1995) en pulpa de café a 30 días de fermentación. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cenizas para las semanas 0, 1, 3 y 4 demostrando que el tiempo es un factor determinante para el aumento del contenido de cenizas, esta es una característica deseable en un alimento para que pueda proporcionar niveles apropiados de minerales necesarios en las dietas para animales.

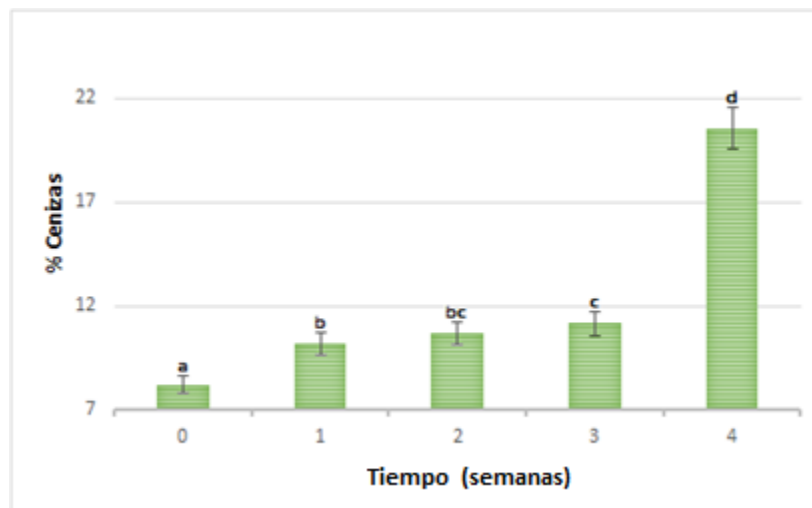


Figura 13.- Gráfica de medias del % de Cenizas a diferentes tiempos de descomposición. Para el análisis estadístico se utilizó el método de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, indicando diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes.

### 7.1.3 Grasa

Se constataron diferencias significativas sólo entre los tiempos 1 y 4, el mayor porcentaje de extracto etéreo se obtuvo en la semana 1 con 1.66%, el cual presentó una diferencia mínima significativa con los tiempos 0, 3 y 4 (Figura 15). Comparando los resultados de este experimento con los reportados por Noriega *et al.* (2009) y Ferrer *et al.* (1995), se obtuvo un bajo contenido de grasas, reportaron un 3.86% y 5.02% respectivamente de extracto etéreo en pulpa de café sin fermentar mientras que en este trabajo se obtuvo 1.19%. Estas discrepancias entre los valores encontrados y los señalados en la literatura se pueden explicar debido a que las pulpas analizadas se sometieron a diferentes tiempos de fermentación y no se le adicionó aditivo como lo hizo Ferrer *et al.* (1995). Durante la fermentación anaeróbica se favorece la actividad enzimática de los microorganismos presentes en la pulpa de café, la cual es muy rica en azúcares fermentables, estos azúcares pudieron contribuir hasta cierto límite con la formación de sustancias solubles en compuestos orgánicos.

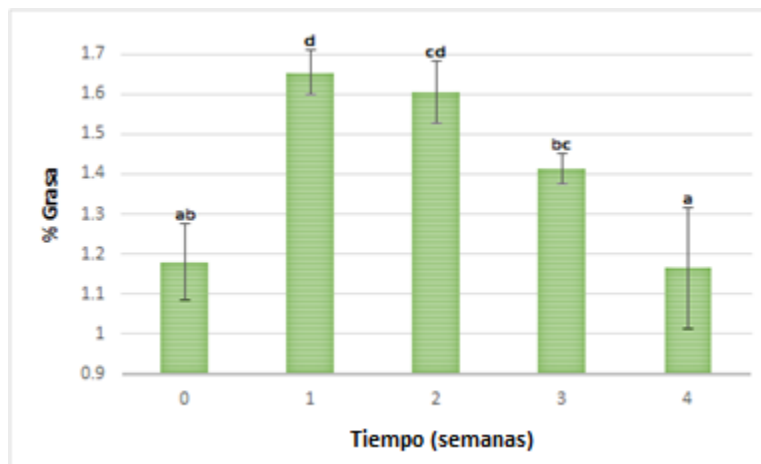


Figura 14.- Gráfica de medias del % de Extracto etéreo de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición. Método de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, indicando diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes.

### 7.1.4 Proteína cruda

El valor promedio de la proteína cruda en todos los tiempos de descomposición fue de 12.75%; iniciando con 9.72% en peso seco y tuvo tendencia al alza llegando a 15.89% en la cuarta semana, superando lo reportado por Villalba *et al.* (2011) donde el porcentaje de proteína al inicio y a los 21 días fue de 3.87 y 11.65%,

respectivamente. Este incremento de proteína con el paso del tiempo se debe a la producción de biomasa, principalmente de levaduras, ya que contienen entre 40 y 45% de proteína en base seca. Noriega *et al.* (2009) clasificaron a los alimentos para animales como de regular calidad cuando contiene valores entre 7 y 9% de proteína y de buena calidad con valores mayores a 9%, lo que significa que el contenido de proteína cruda en la pulpa de café se torna como un alimento de particular valor nutricional.

### 7.1.5 Fibra cruda

El contenido de fibra cruda presente en la pulpa de café se observa en la Figura 16, como puede apreciarse, el proceso de degradación natural ayuda a aumentar el contenido de fibra cruda, todos los valores presentan diferencia estadística significativa entre ellas, presentando la mayor concentración en la semana 4 (23.67%). Al igual que la proteína cruda, el aumento de fibra se atribuye a la producción de biomasa, los hongos contienen entre 10 y 15% de fibra, la mayoría presente en la pared celular. Es posible que el alto contenido de fibra cruda sea un factor limitante en la utilización de la pulpa de café. Van Severen & Carbonell (1999) caracterizaron la pulpa de café para evaluar su digestibilidad y obtuvieron un 19.3% de fibra cruda mientras que Martínez (1998) reportó un contenido del 27.45% para evaluar posibles usos económicos.

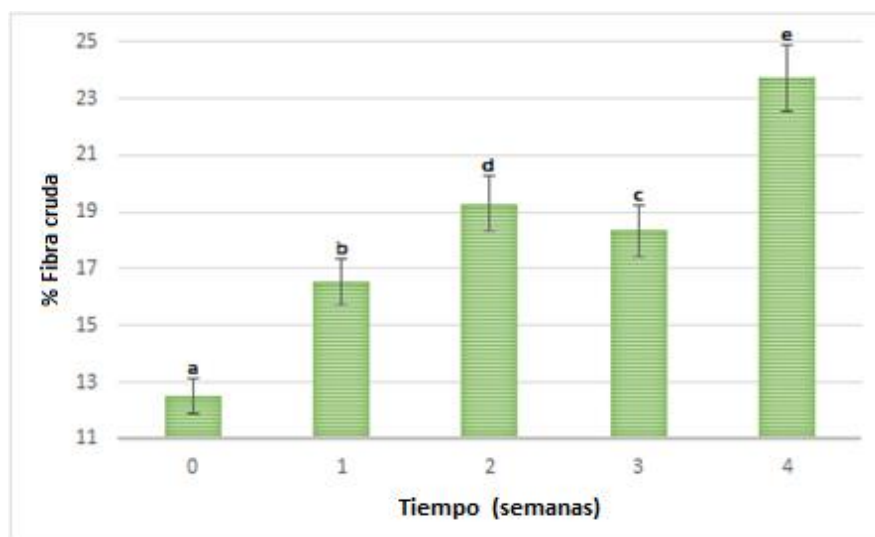


Figura 15.- Gráfica de medias del contenido de Fibra cruda. Análisis LSD con un nivel de confianza del 95%, indicando diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes.

### 7.1.6 Azúcares reductores

El tiempo es un factor que determinó la concentración de azúcares reductores con tendencia a disminuir como se observa en la Figura 17, presentando diferencias significativas entre las medias. Esta tendencia a disminuir se debe al proceso de fermentación natural donde los microorganismos, básicamente bacterias y levaduras mediante sus enzimas naturales oxidan parcialmente los azúcares y producen energía (ATP), etanol, ácido láctico y acético, alcoholes, sustancias volátiles como aldehídos, cetonas y ésteres, y dióxido de carbono. El porcentaje de azúcares reductores en peso seco de la pulpa de café fue mayor comparándola con lo reportado por Samayoa *et al.* (2014) y Urbaneja *et al.* (1997) quienes evaluaron la concentración de esta característica en pulpa de café fresca obteniendo 12.40% y 21.82% respectivamente, mientras que para la muestra en el tiempo 0 de este estudio se obtuvo un 52.82%.

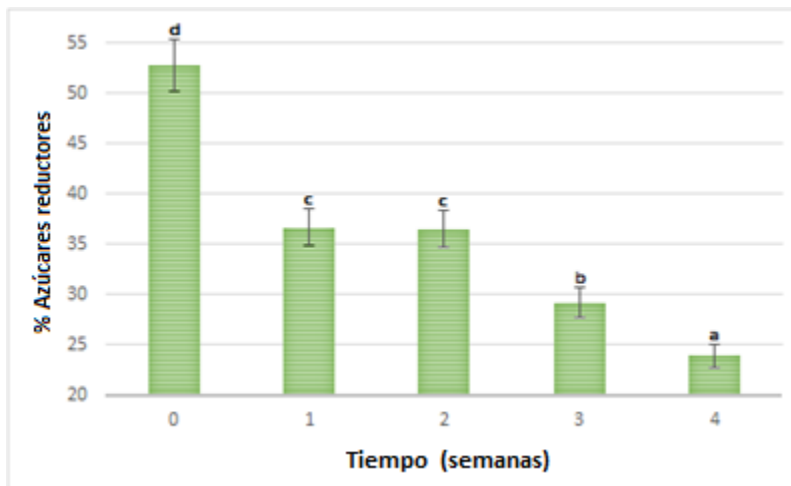


Figura 16.- Comparación gráfica de medias del % de Azúcares reductores en pulpa de café. Indican diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes con un nivel de confianza del 95%.

### 7.1.7 Carbohidratos

La tendencia en el comportamiento de los carbohidratos fue a la baja, disminuyeron con el tiempo de degradación de la pulpa. Hubo diferencias significativas a nivel de tratamientos, encontrándose en la última semana los menores valores (34.11%), lo que explica el aumento de los valores de proteína cruda para ese mismo tiempo debido a que se consumen los carbohidratos para producir biomasa (alto contenido

de proteína). Los resultados obtenidos por Ferrer *et al.* (1995) y Noriega *et al.* (2009) de carbohidratos fue de 61.46% y 60.29% respectivamente, similares al obtenido al momento de iniciar el ensayo.

En la formulación de un determinado alimento, se desea un bajo valor de carbohidratos, pero altos valores en otros compuestos como proteína, grasa y en algunos casos de fibra. De igual forma, Ferrer *et al.* (1995) señalan que fracciones con altos valores de carbohidratos (61.46%) limitan la utilización de la pulpa de café en la alimentación de bovinos, aunque ese obstáculo se eliminaría con la incorporación de melaza y tubérculos en la dieta.

### 7.1.8 Taninos condensables

Para esta variable, el tiempo de degradación afectó significativamente la concentración de taninos presente en la pulpa como se puede observar en la Figura 18. El valor promedio de taninos (0.39%) fue inferior en relación a los reportados por Braham y Bressani (1978) de 1.8 a 8.5% y Ferrer *et al.* (1995) de 1.95%, mientras que Noriega *et al.* (2009) reportaron un promedio de 0.23%. Se considera que los taninos junto a sustancias pépticas totales, cafeína, ácido clorogénico y ácido caféico total son responsables de la toxicidad de la pulpa, por lo que se presume que el hecho de tener la pulpa de café por tanto tiempo fermentada estimula la actividad de las reacciones enzimáticas que pueden convertirlas en sustancias inocuas.

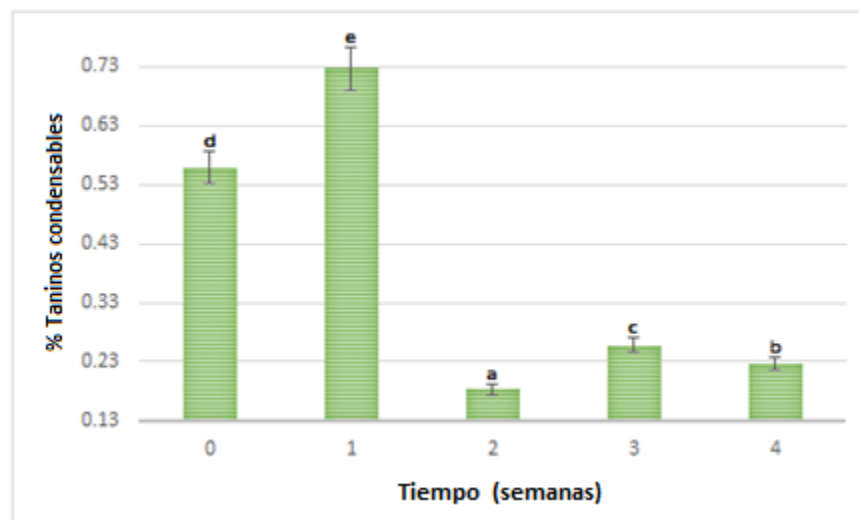


Imagen 17.- Comparación de las medias de los porcentajes de Taninos condensables.

### 7.1.9 Energía calorífica

El valor promedio de energía calorífica en todos los tiempos de degradación es de 3977.101 cal/g de pulpa seca con tendencia a disminuir, iniciando con un valor de 4117.55 cal/g y después de las 4 semanas de degradación natural se presentó un valor de 3787.18 cal/g. Estos valores concuerdan con lo escrito por Porres *et al.* (1987) quienes reportan un poder calórico igual a 3792.872 cal/g de pulpa de café seca para evaluar su uso como combustible directo. Otros autores reportan su posible uso para producción de biogás como Calle (1974) y Arcila (1979) quienes reportan un valor calórico de 128.9 cal/g de pulpa fresca. Esta diferencia entre el poder calórico de la pulpa seca y fresca se debe al alto contenido de humedad en esta última disminuyendo su capacidad de desprender energía.

## 7.2 Extracción de DNA

Tabla 7.- Concentración y calidad de las extracciones de ADN a partir de pulpa de café en diferentes tiempos de degradación. Las extracciones se hicieron por triplicado con el método de extracción CTAB 2X.  
+ = presencia de ADN; / = ausencia de ADN.

Muestra	Repetición	Presencia en gel de agarosa 1%	Cuantificación en Nanodrop	
			$\left[\frac{ng}{\mu l}\right]$	$A \frac{260}{280}$
0	a	+	56.4	1.93
	b	/	38.6	1.85
	c	+	56.7	1.98
1	a	/	33.7	2.08
	b	+	42.9	2.09
	c	+	34.0	1.99
2	a	+	26.5	2.03
	b	+	48.0	1.97
	c	+	25.4	1.91
3	a	+	62.8	1.93
	b	+	45.3	2.04
	c	/	46.7	1.96
4	a	+	43.8	1.88
	b	/	117.2	1.65
	c	+	123.1	1.96

En la tabla 7 se observan los resultados obtenidos de las extracciones de DNA a partir de pulpa de café en diferentes tiempos de degradación empleando 2 pretratamientos, la extracción de AGV's y lavados con buffer de fosfatos, y el método CTAB 2x para la extracción de DNA. Se puede observar que con el método utilizado se obtiene un DNA de buena calidad y cantidad, ya que la mayoría de los valores de la relación A 260/280 están dentro del rango aceptable (1.6 – 2.0). Las muestras que presentan una mala calidad es debido a la presencia de sustancias producidas en la fermentación que interfieren con la acción de las soluciones utilizadas en el proceso de extracción, confirmando lo descrito por Guillén *et al.* (2015) donde mencionan la dificultad para lograr obtener un DNA de buena calidad y en cantidad suficiente para estudios posteriores debido a las características altamente dinámicas del proceso de degradación; los autores evalúan 4 métodos de laboratorio y 2 kits comerciales obteniendo mejores resultados con el método de lisozima (30.5 ng/ $\mu$ L) con un porcentaje relativo de impurezas del 15%, lo que lleva a afirmar que el método con el que se obtiene mejores resultados es el utilizado en esta investigación, ya que se obtiene un valor promedio de la relación A 260/280 de 1.95 con una concentración de hasta 123 ng/ $\mu$ L y es posible realizar estudios posteriores con el DNA obtenido.



## 8. CONCLUSIONES

La pulpa de café genera la mayor fuente de contaminación ambiental en las zonas cafetaleras y ahora que ya se conocen sus características físico-químicas es posible proponer usos alternativos para mitigar el impacto al medio ambiente. Este residuo presentó potencial para su uso como alimento para animales, sustrato para la producción de lombricomposta o producción de biogás, ya que se obtuvieron niveles bajos de taninos condensables (0.23%), azúcares reductores (23.89%) y carbohidratos (34.11%) tras 4 semanas de degradación natural y con tendencia a disminuir, lo contrario se observó con la proteína cruda (15.9%), fibra cruda (23.68%), cenizas (20.55%) y grasa (1.66%), que aumentaron su concentración conforme avanzaba el proceso de descomposición.

A pesar de la complejidad de las muestras se logró estandarizar un método para la obtención de DNA de buena calidad y cantidad suficiente para estudios posteriores, involucra tratamientos previos con el método de Folch para eliminar ácidos grasos volátiles y lavados con buffer de fosfatos para eliminar contaminantes orgánicos, obteniendo una concentración de hasta 123 ng/ $\mu$ L de DNA con valores de A 260/280 aceptables.

En general, se concluye que la pulpa de café es un subproducto con una alta riqueza microbiana y nutrimental que debe ser aprovechada para frenar la contaminación de las aguas y suelos de las zonas cafetaleras.

## 9. COMPETENCIAS DESARROLLADAS

**Adaptabilidad:** Capacidad para permanecer eficaz dentro de un medio cambiante, así como a la hora de enfrentarse con nuevas tareas, retos y personas.

**Análisis de problemas:** Eficacia para identificar un problema y los datos pertinentes al respecto, reconocer la información relevante y las posibles causas del mismo.

**Automotivación:** Importancia de trabajar por satisfacción personal, necesidad de alcanzar los objetivos establecidos con éxito y mejorar académica y profesionalmente.

**Comunicación escrita:** Capacidad para redactar las ideas de forma gramaticalmente correcta, de manera que sean entendidas sin que exista un conocimiento previo de lo que se está leyendo.

**Creatividad:** Capacidad para proponer soluciones imaginativas y originales. Innovación e identificación de alternativas contrapuestas a los métodos y enfoques tradicionales.

**Independencia:** Decisiones basadas en las propias convicciones.

**Iniciativa:** Influencia activa en los acontecimientos, visión de oportunidades y actuación por decisión propia.

**Planificación y organización:** Capacidad para realizar de forma eficaz un plan apropiado de actuación con el fin de alcanzar el objetivo.

**Sociabilidad:** Capacidad para mezclarse fácilmente con otras personas. Abierto y participativo.

**Trabajo en equipo:** Interés, predisposición y capacidad para trabajar con otros y perseguir metas comunes en el laboratorio.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Arcila O., F. (1979) Producción de biogás a base de pulpa de café. Chinchiná, Guatemala: CENICafé.
- Ayala Torres A.; Hernández Zarazúa I. L.; Aguilera Barreyro A. (2008). Implementación de la técnica de Folch para la extracción de grasas en frío. Querétaro, México
- Blandón Castaño Gladis; Dávila-Arias María Teresa; Rodríguez-Valencia Nelson. (1999). Caracterización microbiológica y fisicoquímica de la pulpa de café sola y con mucilago, en proceso de lombricompostaje. Colombia: CENICafé.
- Braham J. y R. Bressani. (1978). Coffee pulp. Composition, technology and utilization. Institute of Nutrition of Central America and Panama. Inter. Develop. Res. Centre. Ottawa, Canada.
- Calle V., H. (1974) Como producir gas combustible con pulpa de café. Chinchiná, Guatemala: CENICafé.
- Cano Flores, Milagros; Delfín Flor Lucila; Díaz Cerón Ana; García Teresa; González Rafael. (2005). Estudio de mercado sobre el consumo de café en la ciudad de Xalapa, Veracruz. Veracruz, México.
- Cinza Borrelli, Rosa; Visconti, Attilio; Mennella, Carmela; Anese, Monica; Fogliano, Vincenzo. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. Udine, Italy: Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- Davis Aaron P.; Govaerts Rafael; Bridson Diane M.; Stoffelen Piet. (2007). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). London, UK: Botanical Journal of the Linnaean Society.
- Días Curay, Alejandra. (2011). Pulpa de café (*Coffea arabica* L.) como fuente alternativa de antioxidantes. Ecuador: Universidad de Loja.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*.
- Duicela Luis; Farfán Diana; García José; Corral Rubén; Chilán William. (2004). Post-cosecha y calidad del café arábigo. Ecuador: IMPREGCOL.
- FAO a. (2011). Reducción de la ocratoxina A en café. Food and Agriculture Organization.
- Ferrer J., G. Páez, M. Chirino y Z. Mármol. (1995). Ensilaje de la pulpa de café. *Rev. Fac. Agron.*
- Guillén-Navarro Karina; David Herrera-López; Mariana Y. López-Chávez; Máximo Cancino-Gómez; Ana L. Reyes-Reyes. (2015). Assessment of methods to recover DNA from bacteria, fungi and archaea in complex environmental samples. México: *Folia Microbiology*.
- He Y, Zhao Y, Zhou G, Huang M (2009) Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from aged refuse for microbial community analysis. *Word J Microbiology Biotechnology*
- ICO - International Coffee Organization. (2014). World coffee trade (1963-2013): A review of the markets, challenges and opportunities facing the sector. London, UK.
- LaMontagne M.G., F.C. Michel Jr., P.A. Holden, C.A. Reddy. (2002). Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. Michigan, USA: *Journal of Microbiological Methods*.

- León, Jorge. (2000). Botánica de los cultivos tropicales. San José, Costa Rica: Editorial Agroamericana.
- Marques Vilela Danielle, Vinícius de M. Pereira Gilberto, Cristina Ferreira Silva, Luís Roberto Batista, Rosane Freitas Schwan. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). Brazil: Food Microbiology Journal.
- Martinez Nadal, N. G. (1998). Coffe by-products. Their chemical composition and posible economic uses. Coffee and Tea Industries and the flavor field.
- Molina Mario; Lechuga Otto; Bressani Ricardo. (1990). Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentacion sólida usando *Aspergillus niger* en pollos y cerdos. Honduras: Agronomía Mesoamericana.
- Moreno Ponce A. L.; Aguilera Barreyro A.; Escobar García K.; Bernal Santos G.; Reis de Souza T.; Muñóz Hernández G. (2007). Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV's) y pH en el contenido de ciegos de conejos alimentados con una dieta comercial y una experimental. Querétaro, México
- Noriega Salazar, Adrianyela; Silva Acuña Ramón; Moraima García de Salcedo. (2009). Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para uso potencial en la alimentación animal. Venezuela: Zootecnia Trop.
- Porres, C.; Calzada, J.F.; Rolz, C. (1987). Combustión de la pulpa de café. In: Simposio Internacional sobre la utilización Integral de los Subproductos del Café, Guatemala.
- Puerta Quintero, Gloria Inés. (2012). Factores, procesos y controles en la fermentación del café. Colombia: CENICafé.
- Ramírez-Coronel María Ascensión; Nathalie Marnet, V. S. Kumar Kolli, Sevastianos Roussos, Sylvain Guyot, Christopher Augur. (2004). Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by Thiolytic-High-Performance Liquid Chromatography. France: Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- Rodríguez, Fira. (2015). Panorama Agroalimentario: Café 2015. México: DIEES.
- Samayoa Toledo, Ana; Borrayo Herrera, Brizna; Pérez Solares, Alejandra. (2014). Extracción de mucílago, azúcares y taninos de la pulpa del café y producción de ácido acético comercial a partir de las mieles del café. Guatemala: Universidad de San Carlos
- Santos, Rui C. (2010). Valor energético de los alimentos. Ejemplo de una determinación experimental usando calorimetría de combustión. Lisboa, Portugal: Quim. Nova.
- Suarez Agudelo, Jesús María. (2012). Aprovechamiento de los residuos sólidos provenientes del beneficio del café, en el municipio de Betania Antioquia: usos y aplicaciones. Antioquia, Colombia: Corporación Universitaria Lasallista.
- Temis Pérez, A. L.; López-Malo Vigil A.; Sosa Morales M.E. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. Puebla, México: Universidad de las Américas Puebla.

- Terry, A. I.; Rodríguez, S.; Bermúdez, R. C.; Fernández, M.; Aguilera, I.; Buzón, J. (2005). Evaluación de un inóculo para el arranque de reactores UASB empleados en el tratamiento de residual líquido de café. Santiago de Cuba, Cuba: Revista Cubana de Química.
- Urbaneja Gladys; Ferrer José; Páez Gisela; Moreno Lilia; Sandoval Luis. (1997). Hidrolisis acida y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café. Venezuela: Revolución Agronómica.
- Van Severen, M. L. & Carbonell, R. (1999). Estudios sobre digestibilidad de la pulpa de café y de la hoja de banano. El café de El Salvador.
- Villalba Diana K.; Vilma A. Holguin; Julián A. Acuña; Roberto Piñeros Varon. (2011). Bromatological and organoleptic quality of organic waste silages of coffee-musaceous production system. Colombiana: Revista colombiana de Ciencia Animal.
- Waller, J.M.; Bigger M.; Hillocks R.J. (2007). Coffee pests, diseases and their management. London, UK: CABI.
- Wintgens Jean Nicolas. (2004). Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production. London, UK.
- Yang Zh. H.; Y. Xiao; G. M. Zeng; Zh. Y. Xu; Y. Sh. Liu. (2007). Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. Applied Microbiology Biotechnology.