UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Aplicación de pretratamientos enzimáticos y de ultrasonido para la extracción de cafeína con CO_2 supercrítico en pulpa de café

Juan Diego Torres De La Ossa

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales
Medellín, Colombia
2025

Aplicación de pretratamientos enzimáticos y de ultrasonido para la extracción de cafeína con CO_2 supercrítico en pulpa de café

Juan Diego Torres De La Ossa

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería de Materiales y Procesos

Director (a):

D. Sc. Edith Marleny Cadena Chamorro

Codirector (a):

D. Sc. Luz Marina Ocampo Carmona
Ingeniera Química, M.Sc. y D.Sc. en Ingeniería Metalúrgica y de Materiales

Líneas de Investigación:

Aprovechamiento y valorización de residuos

Grupos de Investigación:

Ciencia y Tecnología de Materiales

Biofibras y Derivados Vegetales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales

Medellín, Colombia

2025

A mi madre, Denis Isabel

A mi padre, Roberto

A mis hermanos, Rober, Luis y Ricardo

A mis amistades,

A Laura,

Por acompañarme y darme fuerzas en cada uno de mis pasos

Non est ad astra mollis e terris via

Séneca

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

_____

Juan Diego Torres De La Ossa

13/09/2025

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el marco del proyecto titulado *“Aprovechamiento de residuos del café en el desarrollo de líquidos iónicos base cafeína para la desulfuración de combustibles”* (código Hermes 57586), financiado en la Convocatoria Nacional para el Fomento de Alianzas Estratégicas Interdisciplinarias que articulan los procesos misionales de la Universidad Nacional de Colombia (2022–2024).

Expreso mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo institucional brindado y, de manera especial, a los grupos de investigación *Ciencia y Tecnología de Materiales* y *Biofibras y Derivados Vegetales*, por ofrecer el marco académico y científico que hizo posible la realización de este proyecto.

Agradezco de manera particular a mis directoras, la D. Sc. Edith Marleny Cadena Chamorro y la D. Sc. Luz Marina Ocampo Carmona, por su orientación, exigencia académica y acompañamiento constante durante el desarrollo de esta tesis, así como por la confianza depositada en mi trabajo.

Finalmente, extiendo un sincero reconocimiento al equipo del Laboratorio de Procesos Agrícolas, cuyo apoyo técnico y humano fue fundamental en la ejecución experimental de esta investigación.

Resumen

La pulpa de café, que representa alrededor del 40 % del peso del fruto, constituye un subproducto abundante del beneficio que, al no ser tratado, genera problemas ambientales. Su composición lignocelulósica y el contenido de metabolitos bioactivos le confieren un alto potencial de valorización. El objetivo de este trabajo fue evaluar procesos enzimáticos hidrolíticos y su integración con tecnologías físicas y verdes de extracción, orientados a la recuperación de cafeína a partir de residuos del café y al aprovechamiento de los residuos resultantes. Se aplicaron tratamientos enzimáticos con Cellic CTeC y Viscozyme, así como la combinación con ultrasonido y extracción con CO_2 supercrítico, complementados con análisis de superficie de respuesta y caracterización composicional. Los resultados mostraron que la hidrólisis enzimática incrementó la liberación de azúcares, mientras que Cellic CTeC promovió mayor liberación de cafeína. El pretratamiento de ultrasonido no evidenció sinergia. La integración del tratamiento enzimático con CO_2 supercrítico mejoró la accesibilidad al alcaloide, con condiciones óptimas estimadas en 70,1 °C, 190 bar y 12,5 U/g. La caracterización lignocelulósica del residuo reveló un aumento en celulosa y hemicelulosa y una reducción de cenizas, favoreciendo su aprovechamiento en bioconversión. En conclusión, los resultados confirman que la valorización de la pulpa de café mediante estrategias integradas de hidrólisis enzimática y extracción verde es técnicamente viable y se alinea con un enfoque de biorefinería orientado a la recuperación de compuestos de interés y a la generación de residuos con valor agregado.

Palabras clave: Pulpa de café, Hidrólisis enzimática, Cafeína, Extracción con fluidos supercríticos, Valorización de subproductos.

Application of Enzymatic and Ultrasound Pretreatments in Supercritical CO_2 Extraction of Caffeine from Coffee Pulp

Abstract

Coffee pulp, which represents approximately 40% of the fruit's weight, is an abundant by-product of wet processing that, if not properly treated, generates environmental problems. Its lignocellulosic composition and the presence of bioactive metabolites confer high potential for valorization. The aim of this study was to evaluate hydrolytic enzymatic processes and their integration with physical and green extraction technologies, targeting caffeine recovery from coffee residues and the utilization of the resulting by-products. Enzymatic treatments with Cellic CTeC and Viscozyme were applied, along with combinations of ultrasound and supercritical CO_2 extraction, complemented by response surface methodology and compositional characterization. Results showed that enzymatic hydrolysis enhanced the release of structural sugars, while Cellic CTeC promoted greater caffeine liberation. Ultrasonic pretreatment did not exhibit a synergistic effect. The integration of enzymatic treatment with supercritical CO_2 improved alkaloid accessibility, with optimal conditions estimated at 70.1 °C, 190 bar, and 12.5 U/g. The lignocellulosic characterization of the residue revealed an increase in cellulose and hemicellulose and a reduction in ash content, favoring its use in bioconversion processes. In conclusion, the findings confirm that the valorization of coffee pulp through integrated strategies of enzymatic hydrolysis and green extraction is technically feasible and aligns with a biorefinery approach aimed at recovering valuable compounds and generating residues with added value.

Keywords: Coffee pulp, Enzymatic hydrolysis, Caffeine, Supercritical fluid extraction extraction, By-product valorization.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XV**

Lista de abreviaturas ..... **XVII**

Lista de tablas ..... **XVI**

Introducción **19**
Objetivos 20
Objetivo general 20
Objetivos específicos 20

1. Capítulo 1: Estado del arte **21**
1.1 El café en Colombia 21
1.2 Beneficio del café en Colombia 23
1.3 Compuestos bioactivos disponibles 28
1.4 Cafeína 29
1.5 Procesos de extracción de cafeína 32
1.5.1 Extracción con solventes 33
1.5.2 Extracción con fluidos supercríticos 35
1.5.3 Extracción con fluidos supercríticos asistida 38

2. Capítulo 2: Materiales y métodos **41**
2.1 Recolección y preparación de muestras 41
2.2 Caracterización lignocelulósica 42
2.3 Azúcares reductores ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.4 Cafeína 43
2.5 Tratamiento enzimático de la pulpa de café 44
2.6 Aplicación de ultrasonido 45
2.7 Extracción con fluidos supercríticos: DoE 46
2.7.1 Diseño experimental 47

3. Capítulo 3: Análisis y discusión de resultados **51**
3.1 Caracterización lignocelulósica 51
3.2 Aplicación tratamientos enzimáticos y ultrasónicos 54
3.2.1 Aplicación de enzimas 54
3.2.2 Evaluación de ultrasonido y enzimas 55
3.2.3 Extracción con fluidos supercríticos 59

4. Capítulo 4: Alternativas de aprovechamiento para subproductos de extracción 71
4.1 Caracterización lignocelulósica post-extracción 72
4.2 Análisis bibliométrico de aplicaciones de la pulpa de café 74
4.3 Usos potenciales:....75
4.3.1 Adsorbentes:....76
4.3.2 Pellets 78
4.3.3 Producción de biocombustibles (bioetanol, biogás, hidrógeno) 78
4.3.4 Pirólisis 81
4.3.5 Alimentación animal 82
4.3.6 Propiedades bioactivas y nutricionales....83
4.3.7 Materiales 85
4.4 Biorefinería 86

5. Conclusiones y recomendaciones 90
5.1 Conclusiones 90
5.2 Recomendaciones 92

Bibliografía 93

A. Anexo 1: Datos experimentales completos....105

B. Anexo: Resultados estadísticos 109

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Ecotopos cafeteros de Colombia 22
Figura 1-2: Métodos de beneficio del café 24
Figura 1-3: Estructura química de la cafeína..... 30
Figura 1-4: Diagrama de fase para el CO_2 35
Figura 2-1: Proceso de preparación de pulpa de café. 42
Figura 2-2: Proceso de hidrólisis enzimática en pulpa de café. 45
Figura 2-3: Proceso de sonicación y posterior hidrólisis enzimática de pulpa de café. 46
Figura 2-4: Curva cinética de extracción de cafeína con CO_2 supercrítico 47
Figura 3-1: Curvas dosificación enzimas Cellic CTeC y Viscozyme. 55
Figura 3-2: Comparación sonicación y enzimas vs enzimas. 57
Figura 3-3: Diagrama de Pareto efectos de estandarizados: Respuesta Rendimiento extracción 62
Figura 3-4: a. Gráfico de contornos para rendimiento. b. Superficie de respuesta. . 62
Figura 3-5: Gráficas de efectos principales para Rendimiento 63
Figura 3-6: Diagrama de Pareto efectos de estandarizados: Respuesta Cafeína en pulpa 66
Figura 3-7: a. Gráfico de contornos para rendimiento. b. Superficie de respuesta. . 67
Figura 3-8: Gráficas de efectos principales para Cafeína en pulpa 67
Figura 3-9: Resultados optimización de respuestas. 68
Figura 4-1: Mapa de palabras generado para aplicaciones de la pulpa de café. 74

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Residuos del proceso de beneficio y transformación de 1 kg de café cereza [11]. 26
Tabla 1-2: Generación anual de residuos año cafetero 2024. [13] 27
Tabla 1-3: Solubilidad de la cafeína en función de solventes y temperatura. 31
Tabla 2-1: Matriz diseño experimental central compuesto ..... **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 3-1: Caracterización lignocelulósica de pulpa de café. 52
Tabla 3-2: Matriz de diseño con variable respuesta Rendimiento 59
Tabla 3-3: Análisis de Varianza 60
Tabla 3-4: Resumen del modelo 61
Tabla 3-5: Matriz de diseño con variable respuesta Cafeína en pulpa 64
Tabla 3-6: Resumen del modelo 65
Tabla 3-7: Análisis de Varianza 65
Tabla 4-1: Efecto del proceso de fluidos supercríticos sobre la caracterización lignocelulósica de la pulpa de café 73

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AC	Carbón activado (Activated Carbon)
ACG	Ácido clorogénico
ADG	Ganancia diaria de peso (*Average Daily Gain*)
ANOVA	Análisis de varianza (Analysis of Variance)
AOT	Sulfosuccinato de dioctilo
AP	Ácido protocatéquico
AT-CP	Pulpa de café tratada con álcalis (*Alkali Treated - Coffee Pulp*)
CCD	Diseño central compuesto (*Central Composite Design*)
Cenicafé	Centro Nacional de Investigación del Café
CMFs	Fibras puras de celulosa de escala micrométrica (*Cellulose Microfibers*)
CSLE	Extracción sólido-líquido convencional (*Conventional Solid-Liquid Extraction*)
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*)
E/S	Relación entre la cantidad de pulpa [g] y enzima [U]
FDA	Administración de Drogas y Alimentos (*Food and Drug Administration*)
FCR	Conversión alimenticia (*Feed Conversion Ratio*)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*)
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem
MB	Azul de metileno (*Methylene Blue*)
R-CP	Pulpa de café cruda (*Raw Coffee Pulp*)
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta (*Response Surface Methodology*)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

SAIL	Líquido iónico tensioactivo (*Surface Active Ionic Liquid*)
SICA	Sistema de Información Cafetera
USAE	Extracción asistida por ultrasonido (*Ultrasound-Assisted Extraction*)
VS	Sólidos volátiles (*Volatile Solids*)
Q_{max}	Capacidad máxima de adsorción

Introducción

El café es una semilla proveniente del árbol o arbusto del cafeto y pertenece a la familia de las rubiáceas. Originario de Etiopía, este grupo botánico abarca más de 100 especies dentro del amplio género Coffea. Entre estas especies, Coffea Arabica y Coffea Canephora (también conocida como Robusta) destacan por su relevancia económica donde abarcan alrededor del 60% y 40% del mercado mundial, respectivamente [1], [2], [3], [4]. Es uno de los commodities más comercializados a nivel mundial, siendo superado solo por el petróleo [1]. En América Latina, Colombia se posiciona como el tercer país con mayor producción, cerrando el periodo 2024 con 15 millones de sacos de 60 kilos de la variedad *Coffea arabica*, lo que representa el 11,7 % de la producción mundial [5].

La cafeína es un alcaloide metilxantínico presente en diversas especies vegetales, particularmente en granos de café y hojas de té, reconocido por sus propiedades estimulantes sobre el sistema nervioso central. Además de su rol fisiológico, la cafeína es ampliamente utilizada en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética, lo que mantiene una demanda creciente a nivel global. Tradicionalmente, su obtención se ha realizado a partir de granos de café mediante técnicas convencionales de extracción sólido-líquido utilizando disolventes orgánicos o acuosos, así como mediante procesos industriales de descafeinización. Sin embargo, estos métodos suelen implicar un elevado consumo de solventes y energía, además de la generación de efluentes contaminantes. En este contexto, han surgido tecnologías más sostenibles, como la extracción con fluidos supercríticos, que permiten una recuperación selectiva de compuestos bioactivos con menores impactos ambientales.

Aunque existe un número significativo de estudios enfocados en la extracción de cafeína a partir de granos y subproductos como la cáscara, la investigación sobre la pulpa de café sigue siendo limitada. Este residuo representa cerca del 40–50 % del peso fresco del fruto y contiene cantidades detectables de cafeína, junto con otros compuestos de interés. Sin embargo, la mayoría de los trabajos se concentran en su uso para compostaje, alimentación

animal o producción de biogás, mientras que su potencial como fuente alternativa de cafeína ha sido poco explorado.

El proceso de producción de café genera grandes cantidades de residuos, principalmente en forma de pulpa, que no reciben un tratamiento adecuado y pueden tener un impacto negativo en el medio ambiente y la salud pública. A pesar de esto, estos residuos podrían ser una fuente potencial de compuestos bioactivos valiosos, como la cafeína, que tienen aplicaciones en diversas industrias. Aunque se han realizado investigaciones sobre la extracción de compuestos bioactivos de otros residuos agroindustriales, aún faltan estudios exhaustivos sobre la extracción y aprovechamiento de compuestos bioactivos de los residuos de café.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el proceso de extracción de cafeína en pulpa de café cereza mediante el uso de CO_2 supercrítico asistido con pretratamientos enzimáticos y de ultrasonido.

Objetivos específicos

- Evaluar la aplicación de procesos enzimáticos hidrolíticos y de ultrasonido en la extracción de cafeína.
- Evaluar la extracción de cafeína con fluidos supercríticos asistido con pretratamientos enzimáticos y ultrasonido mediante un diseño experimental.
- Proponer alternativas de aprovechamiento para los subproductos generados en la extracción de cafeína.

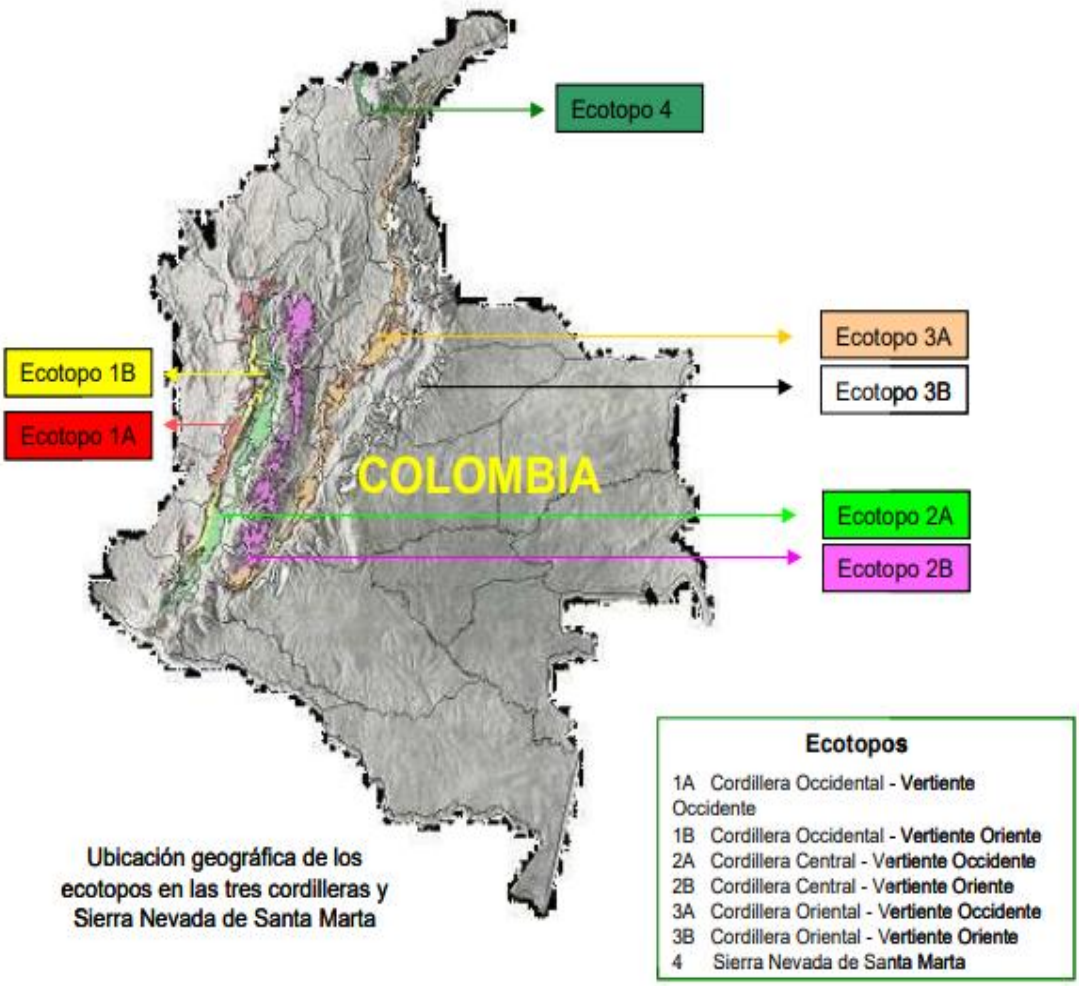
1. Capítulo 1: Estado del arte

Este capítulo presenta el marco de referencia teórico y contextual de la investigación. Se inicia con una descripción de la caficultura en Colombia y del proceso de beneficio del grano, para luego abordar los principales compuestos bioactivos presentes en el café, con énfasis en la cafeína. Finalmente, se revisan los métodos reportados para su extracción, incluyendo el uso de solventes convencionales y las tecnologías de fluidos supercríticos.

1.1 El café en Colombia

El Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafé) desarrolló una clasificación de las zonas cafeteras en el país, conocida como "Ecotopos Cafeteros". Estos ecotopos son regiones agroecológicas con límites geográficos definidos, establecidos en función de las condiciones predominantes de clima, suelo y relieve donde se obtiene una respuesta biológica similar a la del cultivo del café. Como se observa en la Figura 1-1 la mayoría de ecotopos (1, 2, 3) se concentran en la Región Andina y una pequeña área (4) en la Sierra Nevada de Santa Marta. De estas áreas delimitadas, el 33% está distribuido en pastos, el 32% bosque y montaña, el 24% está dedicado al cultivo de café, el 11% se reparte en explotaciones de otros productos: 1% en plátano, 1% en cacao, 1% en otros permanentes, 3% en caña y 5% en usos pecuarios [6].

Figura 1-1: Ecotopos cafeteros de Colombia



Tomado de [6]

Así mismo, la Federación Nacional de Cafeteros reporta en el último informe entregado por el Sistema de Información Cafetera (SICA) que en Colombia existen actualmente 548 mil familias dedicadas a la producción de café, distribuidas en 23 departamentos y 603 municipios del país. Se estima que estas abarcan más de 658 mil fincas cafeteras en Colombia, alcanzando un total de más de 842 mil hectáreas de café sembradas en todo el territorio nacional [7].

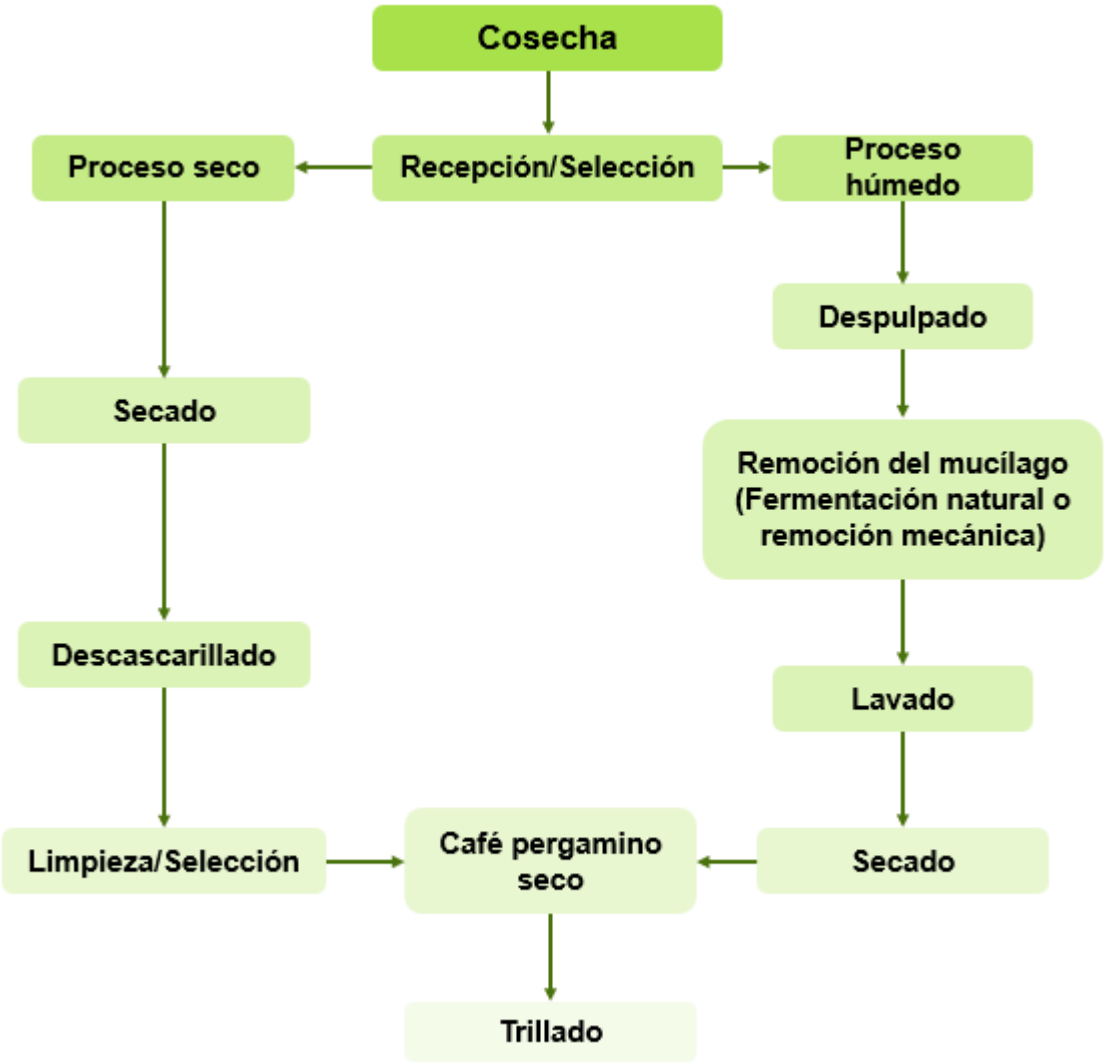
Los residuos tratados en esta investigación fueron recolectados en la zona norte del país, en los departamentos de Cesar y La Guajira donde el 17% de la tierra agrícola está

destinada al cultivo de café. Para el año cafetero 2024 se registraron 27 mil hectáreas de café distribuidas en unas 10.429 fincas, manejadas por 9.891 caficultores, lo que representa el 3% de la producción nacional. Los cafetales se ubican en las laderas de la Sierra Nevada de Santa Marta y la Serranía del Perijá, en pisos templados entre 800 y 2000 m, con áreas que alcanzan hasta 3000 m [8]. Estas condiciones generan cafés diferenciados bajo climas variables, desde ambientes cálidos y secos en las zonas bajas hasta temperaturas moderadas en los relieves montanos La caficultura en estas regiones muestra un nivel intermedio de tecnificación, con un 68% de los cultivos tecnificados. Además, el 35% del área está sembrada con variedades resistentes y el 42% corresponde a cultivos jóvenes [9]. En la actualidad, 23 de los 40 municipios se dedican al cultivo y producción de café, concentrados en la zona norte del departamento del Cesar y Sur del departamento de la Guajira, específicamente en territorios como Pueblo Bello, Valledupar, La Paz, Agustín Codazzi y la Jagua del Pilar, entre otros.

1.2 Beneficio del café en Colombia

Tradicionalmente existen 2 métodos para el proceso de beneficio de café, el proceso húmedo y seco. Cómo se observa en la Figura 1-2, la principal diferencia radica en el uso de agua para el proceso de extracción de la almendra, producto final. El proceso de beneficio seco es el más sencillo y se utiliza principalmente para las variedades Robusta [10]. Después de recibidos los granos, estos se dejan secar a la intemperie hasta que alcancen un 10-12% de humedad y en un paso siguiente se retira la cascarilla de forma mecánica. Finalmente se limpian y seleccionan los granos de mejor calidad.

Figura 1-2: Métodos de beneficio del café



Elaboración propia

En Colombia, se utiliza en su mayoría el proceso húmedo, pues a pesar de que requiere equipos y una infraestructura definida, resulta en un producto de mejor calidad. El proceso empieza cuando se reciben los granos cosechados y se separan por densidad los granos verdes y en mal estado en un separador hidráulico [11]. El siguiente paso es el despulpado, que consiste en retirar la pulpa de la cereza por medio de presión que ejerce la camisa de la despulpadora, con o sin agua. Después de despulpar los granos de café, se almacenan

en tanques con agua y se someten a un proceso de fermentación natural para remover el mucílago. La calidad final del grano depende en gran medida del tiempo de fermentación, que se estima entre 12-18 horas, y varía según la temperatura, la altura de la masa de café en el tanque y si el despulpado se realizó con agua o sin ella. Otra de las técnicas para esta etapa es El desmucilaginado, en la que se remueve el mucílago adherido al grano mediante fricción en equipos especializados, sin necesidad de procesos fermentativos prolongados. Este método reduce significativamente el consumo de agua en comparación con el lavado tradicional y acorta los tiempos de beneficio. Además, contribuye a una mayor uniformidad en la calidad del café y a prácticas de procesamiento más sostenibles.

La siguiente etapa del proceso es el lavado, que permite retirar totalmente el mucílago fermentado del grano. Se usa agua limpia para evitar defectos como el grano manchado, sucio, el sabor a fermento (defectos de sabor y aroma a vinagre, piña o vino, cebolla, rancio o stinker) y la contaminación. Los granos se secan en mallas al ambiente o por secadores rotatorios, para obtener el café pergamino seco, que se empaca y finalmente se envía para su trillado, obteniendo la almendra, que se exporta como producto final.

Una alternativa para mejorar la rentabilidad de la producción de café en Colombia es potenciar los "cafés especiales" en el mercado internacional, debido a su alta calidad y beneficios para la salud, lo que permite obtener mejores precios. Estos cafés, con atributos físicos y sensoriales consistentes, se distinguen por ser sostenibles y verificables. Entre los métodos de procesamiento que contribuyen a estos cafés especiales se encuentra el beneficio semiseco o "Honey" que consiste en retirar parcial o totalmente la pulpa del fruto, con el fin de dejar el grano cubierto de mucílago y lograr una fermentación prolongada y un secado natural del grano al sol o bajo cubierto, lo que le confiere sabores únicos como chocolate, frutos rojos y tostados, particularmente bajo condiciones húmedas como las de la zona cafetera central de Colombia [12].

Dentro del proceso de beneficio del café se generan residuos que, de no ser tratados de la manera correcta pueden terminar contaminando fuentes de agua y generar deterioro de los ecosistemas. Para la preparación de la bebida se usa aproximadamente el 9,6% del fruto, como se muestra en la Tabla 1-1. Alrededor del 65% del fruto de café se convierte en residuo en la etapa del beneficio (despulpado, desmucilaginado) y transformación (trilla),

mientras que en la etapa de preparación de la bebida alrededor del 10% del fruto se genera como residuo en forma de borra.

Tabla 1-1: Residuos del proceso de beneficio y transformación de 1 kg de café cereza [11].

Proceso	Pérdida [g]	Residuo obtenido
Despulpado	394	Pulpa fresca
Desmucilaginado	216	Mucílago
Trilla	35	Cascarilla/Pergamino
Secado	171	Agua
Torrefacción	22	Volátiles
Preparación de bebida	104	Borra
Pérdida acumulada	942	

El principal de los residuos generado durante el beneficio del café cereza es la pulpa. Con una producción para el año cafetero 2024 de aproximadamente 15 millones de sacos de 60 kg equivalentes, se generaron alrededor de 262 mil toneladas de pulpa. Los tipos de residuos generados, así como su cantidad total para el año cafetero 2022 están resumidos en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2: Generación anual de residuos año cafetero 2024. [13]

Tipo de residuo	Cantidad año cafetero 2024 [ton]
Pulpa	331.000
Mucílago	181.000
Cascarilla	29.000
Borra	87.000
Total residuos	628.000
Producción total de café año 2024 [ton]	840000

Los estudios de Cenicafé indican que la pulpa de café contribuye al 73,7% de la potencial contaminación hídrica de los subproductos del beneficio. Durante el despulpado y transporte hidráulico, la pulpa pierde casi la mitad de su peso seco, generando graves problemas de contaminación hídrica. El 26,3% restante de la contaminación proviene del mucílago fermentado, siendo el 80% de esta fracción soluble y con gran capacidad para contaminar. Es fundamental gestionar adecuadamente o tratar este residuo con sistemas biológicos. En un día típico, un recolector de café cosecha 100 kg de café en cereza, liberando pulpa y mucílago durante el beneficio húmedo, con un potencial contaminante 115 veces superior al de las excretas y orina humanas en el mismo período. Aunque las aguas residuales del beneficio húmedo son biodegradables, presentan altas acidez y concentraciones de materia orgánica, con demandas de oxígeno biológicas y químicas significativamente elevadas [14]. En este contexto, la Resolución 0631 de 2015 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible fijó límites máximos permisibles para vertimientos provenientes del beneficio de café, estableciendo valores de DBO_5: 300 mg/L, DQO: 600 mg/L, sólidos suspendidos totales: 200 mg/L, grasas y aceites: 50 mg/L y pH entre 6 y 9, con el fin de mitigar el impacto ambiental de las descargas y obligar a la implementación de tecnologías de bajo consumo de agua y sistemas de tratamiento que garanticen su cumplimiento.

1.3 Compuestos bioactivos disponibles

El compuesto de mayor interés en el café es la cafeína. Sin embargo, en el fruto y en los residuos de éste se encuentran una variedad de sustancias que tienen potenciales aplicaciones y que despiertan el interés de la comunidad científica para su uso en múltiples áreas, como la medicina, la industria alimenticia y la industria farmacéutica. Los granos de café verde se componen principalmente, de polisacáridos como la celulosa y las hemicelulosas, constituyendo aproximadamente el 50% de su peso. Asimismo, contienen carbohidratos solubles, entre ellos los monosacáridos fructosa, glucosa, galactosa y arabinosa, así como oligosacáridos como la sacarosa, rafinosa y estaquiosa. Además, en los granos verdes se han identificado ácidos alifáticos no volátiles como los ácidos cítrico, málico y quínico, y ácidos volátiles como los ácidos acético, propanoico, butanoico, isovalérico y hexanoico, que contribuyen al perfil sensorial final de la bebida [15]. Junto a ellos, también se encuentran ácidos grasos, principalmente palmítico, esteárico y linoleico, que forman parte de la fracción lipídica del grano y juegan un papel relevante en el desarrollo de sabor, la formación de la crema y la estabilidad oxidativa del café [16].

En la borra del café se reportan grandes cantidades de compuestos orgánicos con potenciales usos como compuestos nitrogenados y lípidos. Uno de los compuestos de interés son las sustancias nitrogenadas de tono marrón, que son el resultado de la reacción de Maillard, un proceso químico que ocurre entre azúcares y compuestos que contienen aminoácidos libres. Los productos generados por esta reacción tienen aplicaciones potenciales en la industria alimentaria y como agentes conservantes, debido a sus propiedades antioxidantes y su capacidad para prevenir la oxidación de las grasas. Las melanoidinas, que son el producto final de esta reacción, son compuestos de alto peso molecular que contienen nitrógeno y una pequeña proporción de aminoácidos, principalmente ácido glutámico y glicina. También están presentes en la película plateada y en conjunto con la cafeína y ácidos clorogénicos presentan potencial uso en la industria farmacéutica como inhibidores de actividad de la hialuronidasa, de la expresión de colágeno y de la actividad, la elastasa con propósitos antienvejecimiento [17]. Durante el proceso de elaboración del café, solo se extrae aproximadamente un tercio de la proteína originalmente presente en el grano de café verde [18]. Pacheco et al. [19] reportan la presencia de ácido

protocatéquico (AP), ácido clorogénico (ACG) y cafeína en muestras de cáscaras de café obtenidas de diversas empresas productoras de café del Norte de La Paz, Bolivia.

El ácido protocatéquico es un compuesto fenólico con propiedades farmacológicas diversas y constituye el principal metabolito de los polifenoles antioxidantes presentes en el té verde. Es conocido por tener actividad de eliminación de radicales libres y antioxidantes al disminuir la peroxidación lipídica y aumentar la eliminación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el difenilpicrilhidrazilo (DPPH). Se ha demostrado su relación con el aumento de la actividad antioxidante plasmática en humanos posterior a la ingestión de alimentos ricos en antocianinas, que son los pigmentos hidrosolubles responsables de los colores azul, morado y rojo de muchas plantas. Así mismo, reporta actividad antiinflamatoria al inhibir la actividad de las citoquinas, (mediador dentro del proceso inflamatorio), actividad antihiperglicémica, anticancerígena y antimicrobiana [20], [21]. También se ha demostrado que aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la catalasa, y reduce los niveles de malondialdehído [19].

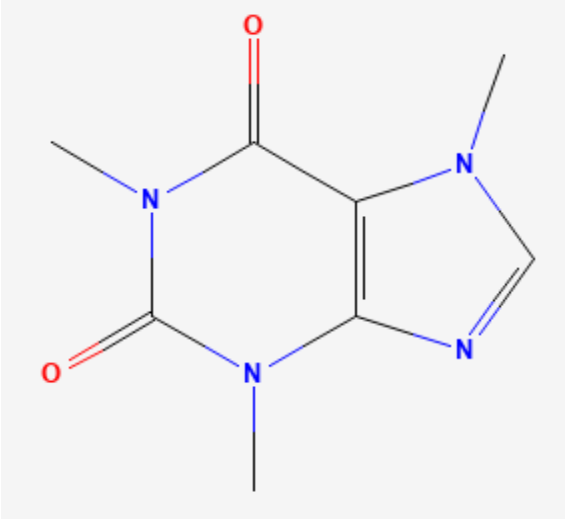
Por otro lado, los ACG, ésteres del ácido cafeico, son precursores de los compuestos responsables del sabor y pigmentos del café tostado. Su contenido varía según la madurez de la especie y otros factores asociados con la calidad del café, como la altitud y la exposición a la sombra. Los ACG se utilizan en la prevención de enfermedades dentales al formar una película protectora contra las bacterias. Además, se ha observado un efecto preventivo en ciertas adicciones a las drogas [19]. Se ha demostrado in vitro que los ácidos clorogénicos son voraces eliminadores de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como aniones superóxido o radicales hidroxilo. Estos son productos del oxígeno que no contribuyen a la síntesis de ATP, denominados también como radicales libres. Así mismo, se ha postulado que los ácidos clorogénicos ayudan a preservar la integridad general del ADN y reducen la probabilidad de cáncer [22].

1.4 Cafeína

La cafeína 1, 3, 7 trimetilxantina, observada en la Figura 1-3 es un alcaloide natural que se encuentra en los granos de café, hojas de té, en el cacao y en otras plantas y es considerada la sustancia farmacológica ingerida con más frecuencia en el mundo. Junto con la teofilina

y la teobromina son los compuestos de la familia de las metilxantinas de mayor interés. En su estado puro, la cafeína es un polvo incoloro a temperatura ambiente, sin olor y con un ligero sabor amargo. Tiene un punto de sublimación a 180°C y un punto de fusión de 136°C, bajo presión. La cafeína es soluble en agua caliente, aunque a temperatura ambiente el cloroformo es uno de los disolventes más eficaces, como se observa en la Tabla 1-3 [23].

Figura 1-3: Estructura química de la cafeína



Tomado de [24]

Tabla 1-3: Solubilidad de la cafeína en función de solventes y temperatura.

Solvente	Temp. [°C]	Solub. [% w/w]
Agua	25	2,2
	100	66,7
Alcohol	25	1,2
	600	4,5
Éter	25	0,3
Acetato de etilo	25	2,5
Cloroformo	25	18,0
Acetona	25	2,0
Benceno	25	1,0

El 74% del uso mundial de la cafeína es en bebidas por sus propiedades energéticas y estimulantes. Una taza de café (150 ml) tostado/molido contiene entre 30-170 mg de cafeína. El té y las bebidas de cola normales contienen 8-91 mg y 15-24 mg de cafeína por taza respectivamente. En general, el consumo medio de cafeína de un adulto es inferior a 300 mg/día. El 25% de la cafeína mundial se utiliza en la industria farmacéutica, siendo un compuesto de gran interés. En general, no se ha encontrado evidencia que lo asocie directamente a la formación de cáncer y estudios demuestran su protección contra carcinógenos, así como actividad antioxidante y reducción de algunas enfermedades como la cirrosis, enfermedad hepática y protección contra efectos de la radioterapia. Este alcaloide pertenece al grupo de medicmentos denominados estimulantes del sistema nervioso central y está presente en combinación con otros productos farmacéuticos usados como estimulantes, analgésicos, diuréticos, remedios para el resfriado, productos de control de peso, estimulantes bronquiales y cardiacos, así como tratamientos para el acné y otros trastornos de la piel [25], [26]. El restante 1% de la aplicación mundial de la cafeína es la industria química, donde se utilizada ampliamente para la síntesis de otros compuestos. Debido a sus propiedades como no toxicidad, estabilidad a la humedad, naturaleza no

corrosiva y bio-disponibilidad en variedad de especies como café o té, la cafeína como catalizador en síntesis orgánica toma relevancia en la investigación [27].

En los últimos años la cafeína se ha integrado como reactivo a la síntesis de líquidos iónicos, sales compuestas por un catión y un anión orgánicos o inorgánicos que permanece en estado líquido por debajo de 100 °C, caracterizados como solventes verdes, como presión de vapor extremadamente baja, un amplio rango de líquidos, polaridad sintonizable, no inflamabilidad, amplia solubilidad, gran estabilidad física y química, capacidad para reutilizarse en los procesos y su fácil manipulación [28]. Se reportan múltiples estudios donde se demuestra la posibilidad de sintetizar líquidos iónicos a partir de cafeína, con variedad de aplicaciones. Salami et al. [29], [30], [31] sintetizaron y caracterizaron un líquido iónico como catalizador para la síntesis de xantenediones, una importante clase estructural de heterociclos de oxígeno con amplia gama de propiedades biológicas y farmacéuticas, como antiplasmódicas, antibacterianas, analgésicas, antinflamatorias, antipalúdicas y potenciadoras de la cloroquina, antimicrobianas y antioxidantes, entre otras. Así mismo, se ha desarrollado un catalizador en base sulfato de hidrógeno sílica-cafeína de procedimiento simple, fácil montaje, reusable y con alta eficiencia para la síntesis de tetrahidrobenzo[b]piranos, moléculas heterocíclicas usadas ampliamente como anticoagulantes, diuréticos, agentes espasmóliticos (relajantes musculares), anticancerígenos y antianafilácticos (antialérgicos) [31], [32].

Por otra parte, se ha sintetizado un líquido iónico tensioactivo (SAIL) biodegradable basado en cafeína y sulfosuccinato de dioctilo (AOT) para desarrollar complejos coloidales antimicrobianos [33] y líquidos iónicos complejos de cafeína, trietanolamina y ZnBr2 con aplicación como material de electrodo en supercondensadores y superconductores [34]. Además de las aplicaciones farmacéuticas, estas moléculas se han utilizado en tecnologías láser, tintes estables, como fluoróforos de etiquetado de proteínas y sensores fluorescentes debido a sus valiosas propiedades espectroscópicas.

1.5 Procesos de extracción de cafeína

Los compuestos bioactivos que se encuentran en matrices de origen vegetal pueden ser extraídos mediante una variedad de técnicas de extracción convencionales. Estas técnicas

en su mayoría se basan en la capacidad de los disolventes utilizados para extraer estos compuestos, a menudo combinados con la aplicación de calor y agitación [35]. La extracción de cafeína tiene relevancia dentro del proceso de producción de café descafeinado. Este producto tuvo su inicio alrededor de 1900, cuando el alemán Ludwig Roselius desarrolló el primer proceso de descafeinado, así como la empresa con la que comercializó el producto, Kaffee HAG en 1912 [36]. Los diferentes métodos de descafeinado pueden ser clasificados en 2 grupos: Extracción con solventes (orgánicos, agua) y extracción con fluidos supercríticos.

1.5.1 Extracción con solventes

Este es el principal método para el descafeinado dado su facilidad en infraestructura y costos de operación, aunque se debe asegurar, dependiendo del solvente orgánico de trabajo, que su concentración final en el producto cumpla con los estándares de salud. En el café verde, la cafeína está en conjunto con el ácido clorogénico, por lo que el primer paso del proceso es humectar los granos usando vapor sobrecalentado o un paso de remojo seguido por vapor. Existen 2 métodos básicos para el proceso de descafeinado usando solventes: El primero es la extracción con solventes directa en los granos donde se extrae la mayor parte de la cafeína, seguida de un calentamiento para remover cualquier contenido residual de solvente. El segundo método es una extracción indirecta con solventes: Consiste es una extracción con agua caliente seguida de una extracción de la cafeína de la fase acuosa, sin que los solventes tengan contacto directo con los granos. Después la fase acuosa se concentra para volver a remojar los granos en esta, recuperando los compuestos aromáticos y de sabor [36].

El primer solvente utilizado para el proceso de extracción de cafeína fue el cloruro de metileno (diclorometano), un líquido incoloro, con un olor dulce, no explosivo en combinación con el aire, con vapores no inflamables y punto de ebullición de 40°C [36], [37]. Aunque la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha promulgado regulaciones para que los niveles de este solvente sean inferiores a 10 ppm, se ha identificado que este compuesto es carcinógeno y además contamina la capa de ozono, por lo que su uso ha ido en disminución. El segundo solvente utilizado para la extracción de cafeína es el acetato de etilo, un éster en estado líquido de color claro, volátil,

inflamable, con un característico olor frutal y un punto de ebullición de aproximadamente 77°C [38]. A diferencia del diclorometano, este compuesto se encuentra de forma natural en frutas como el banano, la manzana o la pera y no se cuestiona su toxicidad.

Con respecto a la extracción acuosa, este proceso es denominado el más natural, pues con la adición de absorbentes como el carbón activado los solventes orgánicos dejan de ser necesarios. En general, durante los procesos de descafeinado se dan pérdidas de sólidos de café, que son los encargados de aportar sabor y aroma. Estas pérdidas tienden a ser mayores en los métodos de adsorción en comparación con los procesos de disolventes, por lo que se han desarrollado muchos procesos buscando tener un café lo más parecido al natural, sin usar solventes orgánicos [39], [40].

El proceso acuoso fue desarrollado por la compañía Coffex en 1938 en Suiza, por lo que también se le denomina proceso del agua suiza. Originalmente, el procedimiento implicaba el uso de agua potable para descafeinar los granos hinchados. Una vez eliminada la cafeína, la solución se concentra y reintroduce en los granos descafeinados previamente secados, de los cuales se había extraído la cafeína. De esta manera, se sustituían los componentes no relacionados con la cafeína que, de lo contrario, se perderían. Estas pérdidas pueden reducirse al cargar previamente el adsorbente con sustancias que compartan la misma estructura molecular y tamaño. Este proceso ha sido mejorado al usar la fase acuosa rica en sólidos y sin cafeína (extraída con un filtro de carbón activado) como agua de proceso en un primer paso, garantizando de esta manera que sólo la cafeína se extraiga, mejorando el producto final [36], [40].

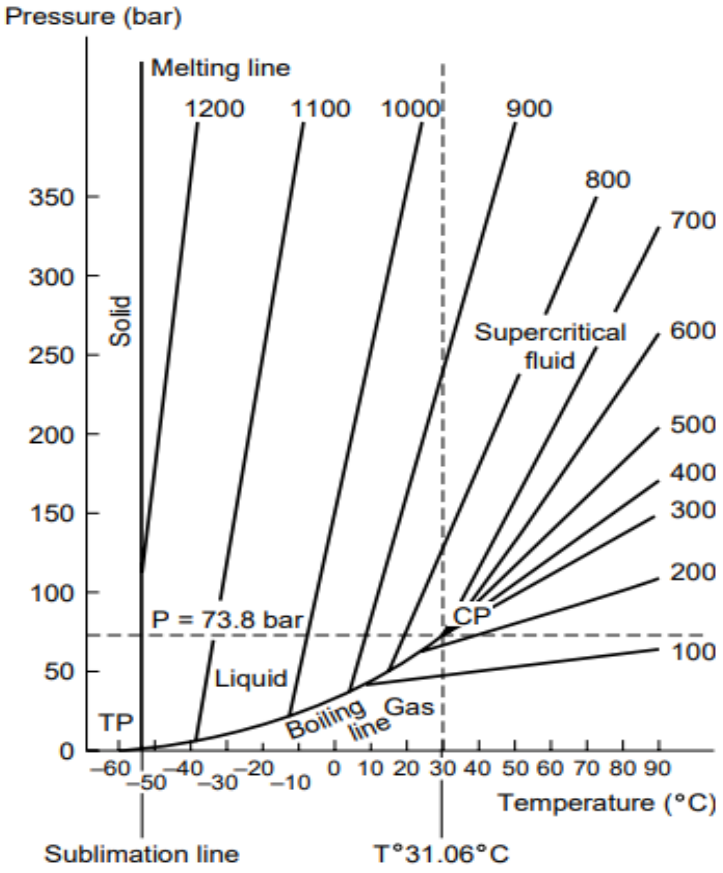
Existen diversos materiales absorbentes utilizados en el proceso de extracción de cafeína, entre ellos carbón activado, tamices moleculares, geles de sílice, bentonitas y resinas de intercambio iónico. Cada material presenta propiedades específicas para adsorber la cafeína y separarla de otros componentes del café, lo que asegura una recuperación efectiva. La selección del absorbente depende del método de descafeinado y las condiciones operativas. Estudios muestran que carbones activados granulares pueden alcanzar capacidades máximas de adsorción (Q_{max}) de hasta 1961 mg de cafeína por gramo [41], mientras que bentonita (en suspensión, en condiciones óptimas) logra eliminación de cafeína superior al 90 %, ajustándose bien al modelo de isoterma de Langmuir [42]. Esto

demuestra que la eficiencia de extracción depende fuertemente de la elección del absorbente, su área superficial y la forma de uso en el proceso.

1.5.2 Extracción con fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. El principal disolvente supercrítico es el dióxido de carbono. Sus condiciones críticas son 31,06 °C y 73,8 bar, como puede observarse en la Figura 1-4. Su amplio uso se debe a que es económico, amigable con el medio ambiente (el CO_2 disponible comercialmente se obtiene como producto secundario de la fermentación), las condiciones de temperatura y presión necesarias para el estado supercrítico no degradan los compuestos de interés y generalmente es reconocido como seguro por la FDA y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) [43].

Figura 1-4: Diagrama de fase para el CO_2



Tomado de [44]

Las primeras nociones del proceso de extracción con fluidos en estado supercrítico fueron descritas por Hannay y Hogarth [45], al descubrir que compuestos sólidos pueden ser disueltos por sustancias bajo estas condiciones. El método de descafeinado utilizando dióxido de carbono comprimido fue desarrollado por Kurt Zosel, quien propuso condiciones de operación en el rango de temperaturas de 70-90°C y presiones de 160-220 bar. A principios de la década de los setenta, este proceso fue patentado y posteriormente licenciado a empresas como Café HAG y General Foods. Esta técnica y sus condiciones óptimas se han utilizado ampliamente en diversas investigaciones relacionadas al descafeinado de los granos de café, así como para la extracción de cafeína de residuos del proceso de beneficio y transformación de éste. Peker, Srinivasan y otros [46], [47], [48] estudiaron la extracción de cafeína y evaluaron los efectos del tiempo de remojo de los granos, flujo, presión y la temperatura. En su publicación aseguran que, al humectar los granos, agregar agua al proceso de extracción e incrementar las presiones y temperaturas se mejoran los rendimientos por el aumento en el valor del coeficiente de partición entre agua-CO_2.

También se ha estudiado la extracción solamente con CO_2 supercrítico, cuya mayor ventaja es la alta pureza con la que es posible extraer cafeína gracias a la selectividad del solvente. Para condiciones de 75°C, 250 bar y 1 hora de extracción, se obtiene una cafeína con una pureza del 83,2%, aunque un bajo porcentaje de extracción del 8,86% [49]. Para aumentar la eficiencia de extracción del proceso, Azevedo et al. [50] exploran como la adición de cosolventes como etanol y alcohol isopropílico modifican la capacidad y selectividad del proceso de extracción de cafeína de granos verdes con CO_2 supercrítico, en aras de aumentar dichas variables de respuesta. Los experimentos fueron realizados a 60°C y 50°C, así como presiones de 15,2, 24,8, y 35,2 MPa y flujo másico de 1,8 g/min de solvente. Como resultados se reporta un rendimiento máximo del 17%, a condiciones óptimas. El etanol mejoró la extracción de cafeína gracias a los puentes de hidrógeno que puede formar con dicho alcaloide; por otra parte, el alcohol isopropílico presenta una selectividad menor hacia la cafeína y arrastra ácidos clorogénicos, dadas sus interacciones menos polares. Estos resultados para el etanol concuerdan con los reportados por Icen et al. [51], quienes

investigaron el efecto del etanol en la extracción de cafeína con CO_2 supercrítico a partir de residuos de tallos y fibras de té. Para este tipo de residuos se encontró que las condiciones óptimas del proceso de extracción fueron: temperatura de 65°C, relación de flujo de 5,23 g etanol/100 g CO2 y una presión de 250 bar, logrando disminuir el tiempo de extracción de 7 horas a 3 horas, con una extracción de 14,95 mg/g. De igual manera se ha estudiado la posibilidad de valorizar los residuos del proceso de beneficio y transformación del café. Tello et al. [52] estudiaron la posibilidad de extraer cafeína a partir de cascarilla de la variedad Robusta. En su estudio, el comportamiento de extracción coincide con los reportados anteriormente para la extracción en granos verdes: Se encontró que las condiciones óptimas para el proceso son: 373 K, 300 bar y una relación solvente-materia de 197 g CO_2/g, además de una relación positiva entre la temperatura y la presión frente al porcentaje de rendimiento, como se ha reportado anteriormente en la literatura. De igual forma, se extrajo cafeína con un máximo de 77% de pureza.

Otro de los residuos de los cuales se ha estudiado su potencial uso es la borra del café. Andrade et al. [53] estudiaron la posibilidad de usar este residuo, junto con la cascarilla para la extracción de compuestos y analizar su actividad antioxidante. Como en el resto de las publicaciones reportadas en esta investigación, se encontró que, al aumentar la presión a temperatura constante, se puede mejorar el rendimiento gracias al aumento de densidad del solvente. Por otro lado, mientras se tenga presión constante, el aumento de la temperatura ocasiona dos efectos contrarios entre sí: Se aumenta el rendimiento gracias al aumento en la presión de vapor, al mismo tiempo que se disminuye la solubilidad por la caída en la densidad del solvente. Para los extractos obtenidos en esta investigación, reportan concentraciones relevantes de ácidos clorogénicos y cafeína, con valores entre 0,66 y 1,13 microg/mg y 23,4 y 684 microg/g, respectivamente.

La extracción con fluidos supercríticos es una de las alternativas más viable, ya que ofrece ventajas como la no toxicidad, la ausencia de disolventes y la alta selectividad en la extracción de cafeína en comparación con métodos como la extracción con solventes orgánicos [54]. Además, en su estado supercrítico presenta hasta tres veces más capacidad cuando está saturado con agua [36], aumentos considerables con cosolventes polares como el etanol y el isopropanol en proporciones de 90% CO_2-10% cosolvente y en condiciones cercanas al punto crítico de éste. Estos incrementos en la solubilidad pueden atribuirse al aumento de las interacciones como la formación de puentes de hidrógeno, así

como efectos estéricos [55]. Las bajas concentraciones de compuestos bioactivos en las plantas obligan a la ciencia moderna a desarrollar métodos de extracción eficaces.

1.5.3 Extracción con fluidos supercríticos asistida

En la actualidad existen técnicas no convencionales de extracción como los pretratamientos enzimáticos y de ultrasonido, que son ampliamente estudiados y pueden acoplarse a la extracción con fluidos supercríticos pues facilitan la ruptura de una compleja red de polisacáridos compuesta principalmente por [56]:

- **Celulosa:** Es un polímero lineal formado por unidades repetitivas de celobiosa, compuestas por ß-D-glucopiranosa unidas mediante enlaces ß-(1,4) glucosídicos. Las cadenas, integradas por 500 a 1400 unidades de glucosa, se organizan en microfibrillas cristalinas, que brindan rigidez a la estructura lignocelulósica.
- **Hemicelulosa:** Este componente incluye polímeros heterogéneos como xilanos, xiloglucanos, mananos y glucomananos, que son amorfos y carecen de rigidez estructural. Esta naturaleza facilita su hidrólisis mediante agentes químicos (ácidos diluidos o bases) o enzimáticos (hemicelulasas).
- **Lignina:** Es un heteropolímero amorfo compuesto por unidades fenólicas (p-cumaril, coniferil y sinapil alcohol), responsables de la hidrofobicidad y rigidez estructural de la matriz.

Estas técnicas auxiliares pueden ayudar a liberar las moléculas bioactivas atrapadas en ella, mejorando la permeabilidad de dichas estructuras al disolvente y haciendo que los compuestos de interés estén más disponibles en la matriz vegetal, lo que en última instancia mejora el rendimiento de la extracción y acorta los tiempos del ciclo del proceso [57].

Los tratamientos enzimáticos se basan en procesos de hidrólisis con la aplicación de enzimas hidrolíticas para modificar componentes lignocelulósicos, degradando las redes de polisacáridos de la pared celular y membranas, liberando los biocompuestos y facilitando de igual manera la penetración del fluido supercrítico por las estructuras celulares. La hidrólisis de la pared celular se lleva a cabo a través de un mecanismo que involucra la formación de un complejo enzima-sustrato, en el que la primera presenta un cambio en su

estructura, que facilita la interacción con el sustrato. Estos cambios provocan tensiones y estrés en este último, lo que promueve las reacciones hidrolíticas [58].

Los pretratamientos enzimáticos acoplados a la extracción con fluidos supercríticos han sido investigados durante los últimos años. Mushtaq et al. [59], [60] evaluaron la extracción de polifenoles no extraíbles por métodos convencionales a partir de residuos del té negro y la compararon con una extracción con solventes convencionales. Para su estudio utilizaron CO_2 en condiciones supercríticas, etanol como cosolvente y múltiples formulaciones de enzimas, de las cuales se encontró que la hidrólisis con kemzima condujo a una mayor liberación de polifenoles y aumentando el rendimiento en 5 veces, comparado con la extracción de control. Además de esto, los polifenoles extraídos mostraron actividad antioxidante. Los mismos autores encontraron que la aplicación de extracción con fluidos supercríticos asistido por enzimas duplicaba la recuperación de extractos crudos con alta actividad antioxidante de residuos de la cáscara de la granada.

Por otro lado, el ultrasonido es un tipo especial de onda sonora que va más allá del oído humano y suele oscilar entre 20 kHz y 100 MHz. Al igual que otras ondas, atraviesa un medio, creando compresión y expansión. Estas fluctuaciones de presión de las ondas ultrasónicas forman microburbujas que colapsan violentamente (cavitación), formando micro chorros que pueden dañar las estructuras celulares, mejorando así la accesibilidad del disolvente y la cinética de transferencia de masa [61], [62], [63]. Esta técnica se ha implementado exitosamente en la extracción con fluidos supercríticos de cafeína. Menzio et al. [64] reportaron que, en 1 hora de extracción, el efecto de las ondas acústicas duplicó el rendimiento de extracción de cafeína y aumentó en aproximadamente 10% la pureza del extracto, usando granos de café enteros. Se implementó el ultrasonido en una configuración simultánea a la extracción con CO_2 supercrítico y las condiciones de operación que dieron el máximo rendimiento fueron 75°C, 250 bar, 40kHz y operación intermitente del ultrasonido de 5 min encendido y 2 apagado. La integración de pretratamientos de hidrólisis enzimática y ultrasonido antes de la extracción con CO_2 supercrítico puede mejorar la transferencia de masa, reducir el tamaño de las partículas, aumentar el área de contacto y mejorar la distribución del disolvente en la matriz vegetal.

2. Capítulo 2: Materiales y métodos

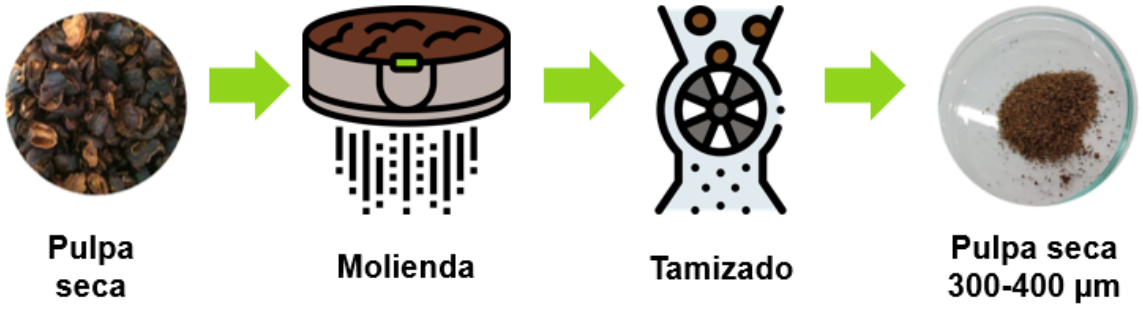
En este capítulo se detallan los procedimientos experimentales empleados en la investigación. Se describe la recolección y preparación de las muestras de pulpa de café, la caracterización química y lignocelulósica, así como las metodologías aplicadas para la determinación de azúcares reductores y cafeína. Se explican los tratamientos enzimáticos y ultrasónicos realizados, y se presenta el diseño experimental implementado para la extracción con fluidos supercríticos.

2.1 Recolección y preparación de muestras

Las muestras de residuos del proceso de beneficio de café variedad Castillo fueron proporcionadas por la Federación Nacional de Cafeteros. El café fue cultivado en el municipio de La Paz, Cesar, corregimiento San José de Oriente, vereda Filo Machete. La recolección de café se hizo de forma manual, seleccionando granos maduros. El residuo se tomó de la etapa de despulpado de dichos granos y se sometió a un proceso de secado al sol por 2 días, a temperaturas promedio de 40°C durante el día.

El proyecto de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Procesos Agrícolas adscrito al Departamento de Ingeniería Agrícola y de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. El proceso incluyó la reducción del tamaño de partícula mediante un molino de cuchillas, seguida de un tamizado con mallas de 40 y 60, como se observa en la Figura 2-1. Se seleccionó la fracción retenida entre estas mallas, con un tamaño de partícula comprendido entre 400 y 600 micras. Las muestras presentaron una humedad promedio de 7,43% y una densidad aparente de 311,25 kg/m^3.

Figura 2-1: Proceso de preparación de pulpa de café.



Elaboración propia

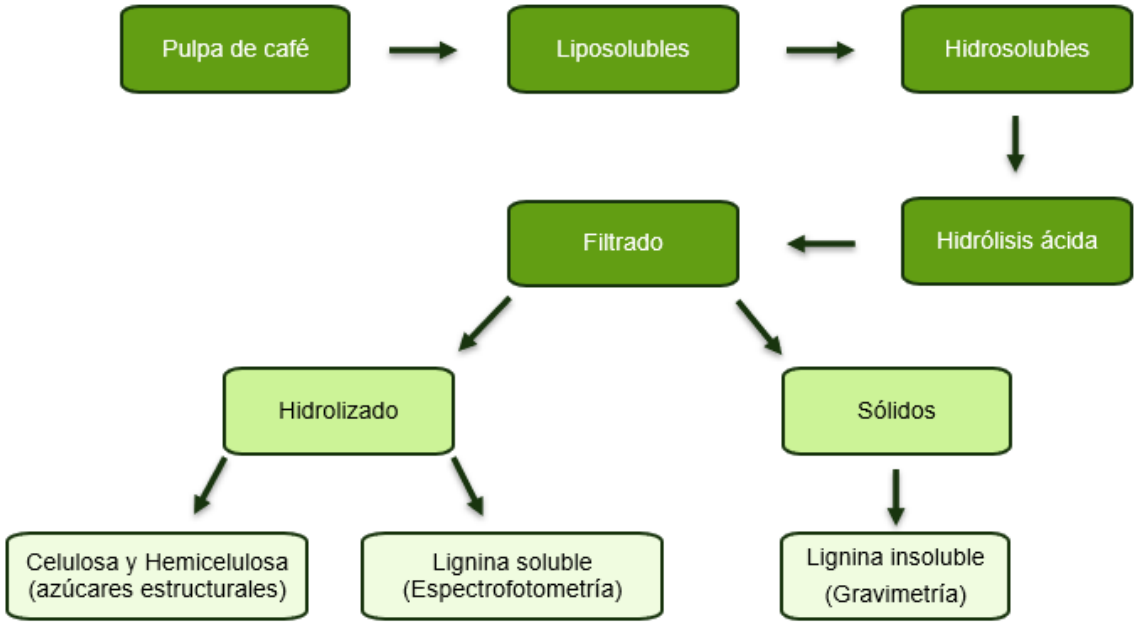
2.2 Caracterización lignocelulósica

La pulpa de café se analizó en función de su composición lignocelulósica utilizando el método estándar TAPPI 222 om-02. Todas las pruebas se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios ± desviación estándar. Para la cuantificación de extractivos liposolubles, se utilizaron 10 g de pulpa de café que se mezclaron con 100 mL de acetona, manteniendo una agitación constante a 110 rpm y 50°C. Se realizaron cambios de solvente cada hora hasta que la tonalidad del extracto se volvió tenue. Las muestras se secaron posteriormente a 85°C durante 12 horas. A continuación, se realizó una extracción de compuestos hidrosolubles utilizando agua destilada a 80 °C con agitación a 110 rpm, cambiando el solvente cada hora.

Para determinar la cantidad de lignina insoluble, se realizó una hidrólisis ácida sobre el residuo generado luego de la extracción lipo e hidrosoluble. En este procedimiento, se añadió ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 72 % a una cantidad conocida de muestra, dejándola reposar durante una hora a 30 °C. Posteriormente, la mezcla fue sometida a autoclave, secada y pesada para calcular el contenido de lignina insoluble. La lignina soluble se evaluó tomando el filtrado del hidrolizado y midiendo su absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 205 nm, utilizando H_2SO_4 al 4 % como blanco. Los contenidos de celulosa y hemicelulosa se determinaron a partir de la hidrólisis ácida, midiendo la concentración de glucosa, xilosa y arabinosa presentes en el filtrado, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés). Se utilizó un equipo

Prominence LC-20AT equipado con un detector de índice de refacción RID20A Columna Aminex HPX-87H (5 micras, 300x7,8 mm) acoplada a una precolumna Biorad Cation H+ (5 micras, 30x4,6 mm). Las condiciones de operación incluyeron 65°C de temperatura, 0.6 mL/min de flujo modo isocrático, 15 µL de inyección, 15 min de corrida, agua 5 mM H_2SO_4 como fase móvil.

Figura 2-2: Proceso de caracterización lignocelulósica



Elaboración propia

El contenido de cenizas se midió transfiriendo 5 g de muestra a un crisol tarado, que se incineró en una mufla a 200 °C durante 60 minutos. Posteriormente, el crisol se enfrió en un desecador y se pesó. El contenido de cenizas se calculó a partir de la diferencia de peso, reflejando los componentes inorgánicos de la muestra.

2.3 Cafeína

La pulpa de café presenta una gran cantidad (alrededor del 40%) de compuestos hidrosolubles, por lo que la cuantificación de cafeína se realizó con una relación 1:500 con

agua destilada para garantizar la extracción completa de la cafeína: 0.5 g de pulpa de café se extrajeron a 80 °C durante una hora con agua destilada (2 x 250 mL).. Los análisis se realizaron por HPLC, se utilizó un cromatógrafo Prominence LC-20AT, equipado con un detector de arreglo de detectores de diodos (PDA, SPD 20AT) a una longitud de onda de 271 nm y una columna C18 (5 micras, 150x4,6 mm) Agilent Zorbax Eclipse Plus acoplada a una pre-columna Zorbax NH2 4-Pack (5 micras, 12,5x4,6mm), 25°C de temperatura, 0,8 mL/min de flujo modo isocrático, 10 µL de inyección, 10 min de corrida, metanol/agua 50/50 como fase móvil.

2.4 Tratamiento enzimático de la pulpa de café

Se llevó a cabo un tratamiento enzimático para la despolimerización de la celulosa y hemicelulosa presentes en la pared celular de la pulpa de café, con el objetivo de aumentar la capacidad de extracción de cafeína en una etapa posterior usando fluidos supercríticos. La efectividad de la hidrólisis enzimática se evaluó a través de la cuantificación de azúcares reductores (glucosa, fructosa, manosa, liberados durante la degradación de la matriz lignocelulósica) y la cuantificación de cafeína en solución. Estos analitos fueron cuantificados a través de HPLC.

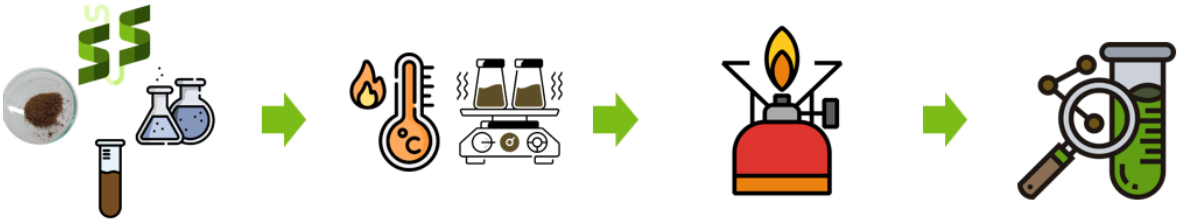
Se emplearon dos cocteles enzimáticos comerciales en la hidrólisis de la pulpa de café. El primero, Viscozyme®, es un producto de Novozymes que contiene una mezcla de carbohidrasas como celulasas, hemicelulasas y pectinasa, diseñadas para descomponer una amplia gama de polisacáridos presentes en la biomasa vegetal. Este coctel es comúnmente utilizado en la degradación de materiales lignocelulósicos por su capacidad de actuar sobre diferentes componentes de la pared celular. Tiene una actividad enzimática de 100 FGBU/g.

El segundo coctel, Cellic® CTec2, también de Novozymes, está optimizado para la conversión eficiente de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables, ya que contiene enzimas específicas como exoglucanasas y β-glucosidasas, que mejoran la conversión de celulosa en glucosa. Tiene una actividad enzimática de 125 FGBU/ml.
Se contrastó la eficiencia de ambos cocteles en la hidrólisis de la pulpa de café para seleccionar el más adecuado, el cual se utilizó en el resto de la fase experimental.

El proceso se llevó a cabo de la siguiente manera:

- **Pre-ensayos:** En esta primera etapa se evaluaron diferentes relaciones entre la cantidad de pulpa [g] y enzima [U] (Relación E/S). Se usaron proporciones de 11, 13, 16, 21 y 32 U/g, variando el peso de la muestra a una cantidad de enzima equivalente a 16 FGBU. La hidrólisis se llevó a cabo en una solución acuosa con buffer citrato en una relación de 3:1 y un pH de 5,0. La mezcla fue sometida a agitación vigorosa a 50°C por 4 horas. Al finalizar la incubación, se detuvo la reacción mediante un calentamiento a 90 °C durante 5 minutos para desactivar las enzimas. El proceso se observa en la Figura 2.2.
- Se tomó el sobrenadante y se realiza una dilución 1:20 para todas las pruebas por HPLC. Las muestras son ultracongeladas para futuros ensayos. Se evaluaron los puntos óptimos de dosificación de enzimas con la liberación de cafeína en solución.
- **Evaluación de ultrasonido/enzimas:** Se evaluó la aplicación de ultrasonido y tratamiento enzimático de manera secuencial, cuantificando la concentración de cafeína posterior al tratamiento combinado**.**

Figura 2-2: Proceso de hidrólisis enzimática en pulpa de café.



2.5 Aplicación de ultrasonido

Se empleó un equipo de sonicación tipo baño de ultrasonido Branson modelo 1800, con una capacidad de 1.91 L y una frecuencia de operación de 40 kHz.

Se evaluó la adición de ultrasonido y enzimas con el objetivo de determinar si su aplicación conjunta tenía un efecto positivo en la extracción de cafeína de la matriz vegetal. Para ello se llevó a cabo la sonicación en el baño ultrasónico a 40 kHz y 50°C durante 30 minutos con agua y buffer de citrato en una relación 3:1. Posterior al tratamiento ultrasónico se añadió el cóctel enzimático para realizar la hidrólisis, que se prolongó por 3 horas y media a 50°C con agitación a 150 rpm. El proceso puede observarse en la Figura 2.3.

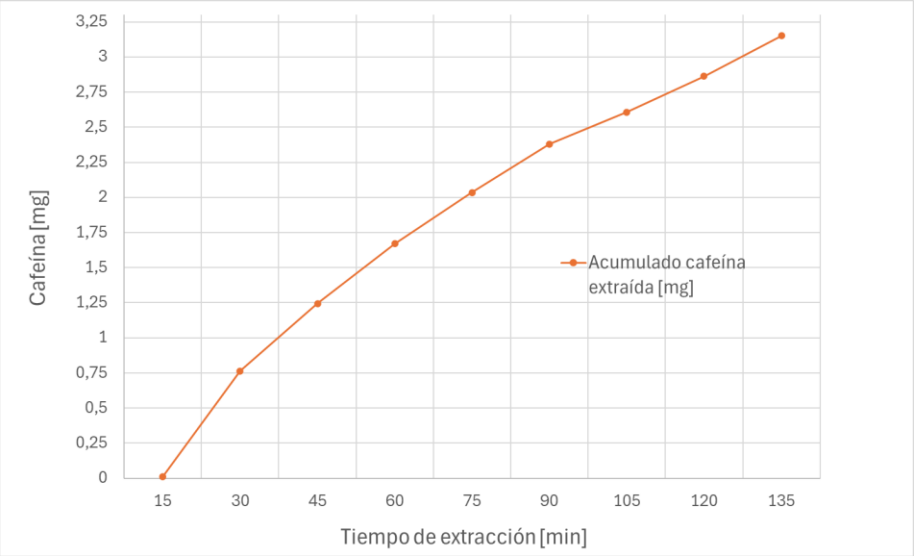
Figura 2-3: Proceso de sonicación y posterior hidrólisis enzimática de pulpa de café.

2.6 Extracción con fluidos supercríticos: DoE

La pulpa de café hidrolizada fue secada a 60°C durante 24 horas posterior a la acción enzimática y reservada hasta su uso para la fase de extracción. El equipo de extracción con fluidos supercríticos usado es un extractor MV-10 ASFE marca Waters, con capacidad para 5 corridas secuenciales.

Se construyó una curva cinética de extracción con el fin de determinar el tiempo óptimo de operación. El análisis mostró que a los 90 minutos se alcanzó aproximadamente el 75 % de la cafeína total extraída en un periodo de 135 min, punto a partir del cual la pendiente de la curva cafeína [mg] vs. tiempo de extracción [min] disminuye como se observa en la Figura 2-4, indicando la transición hacia una fase de extracción más lenta. El fluido que se emplea es CO_2 de grado alimenticio y el cosolvente es etanol al 99%. Se agregó aproximadamente 2 gramos de pulpa de café tratada y se completó el volumen del recipiente (Vessel) con perlas de sílice.

Figura 2-4: Curva cinética de extracción de cafeína con CO_2 supercrítico



2.6.1 Diseño experimental

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas que permiten modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés depende de varias variables independientes cuantitativas, y el objetivo es optimizar dicha respuesta. Se seleccionó un diseño experimental basado en un Diseño Central Compuesto (CCD) para evaluar la influencia de las variables independientes sobre la extracción de cafeína. Las **variables respuesta** fueron:

- Cafeína por gramo de muestra inicial [mg caf/g pulpa seca]: Definida como la cantidad de cafeína extraída [mg] por cantidad de pulpa seca inicial [g].
- Rendimiento extracto seco [%]: Definido como la cantidad de extracto seco [g] por cantidad de muestra inicial seca [g].

Los datos experimentales se ajustaron a un modelo polinómico de segundo orden y se analizaron mediante Análisis de Varianza (ANOVA) para verificar la significancia de los efectos principales e interacciones. El ajuste del modelo, la construcción de superficies de respuesta y la determinación de las condiciones óptimas se realizaron con el software Minitab19.

Factores evaluados:

- **Temperatura**: Nivel mínimo de 40°C y máximo de 70°C.
- **Presión**: Nivel mínimo de 150 bar y máximo de 330 bar.
- **Dosis enzimática**: Nivel mínimo de 0 U/g y máximo de 21,33 U/g.

Variables fijas:

- Tamaño de partícula: 400-600 µm.
- Tiempo de extracción: 90 min
- Humedad: máxima del 5%.
- Flujo de CO2: 10 mL/min.
- Solvente: Etanol.
- Flujo de EtOH: 1 mL/min (10% flujo CO2)

Se efectuaron ajustes en los niveles de las variables independientes debido a limitaciones físicas —como la imposibilidad de emplear dosis enzimáticas negativas— y a restricciones operativas del equipo, que impidieron superar los valores establecidos de presión y temperatura. Una vez ejecutada la matriz experimental, los datos fueron analizados mediante un modelo polinómico de segundo orden ajustado por mínimos cuadrados, considerando términos lineales, cuadráticos e interacciones que superaran el nivel de significancia. Esta se evaluó mediante un ANOVA, empleando un nivel de confianza del 95 % (α=0,05). Adicionalmente, se calcularon los coeficientes de determinación (R^2, R^2 ajustado y R^2 predicho) y se verificó la adecuación del modelo a través de pruebas de falta de ajuste y análisis de residuos. El procedimiento de optimización de las variables se realizó con el módulo de superficie de respuesta del software Minitab, definiendo como criterio la maximización de las variables respuesta. El diseño experimental se resume en la Tabla 2-1.

Se realizó una validación para el punto óptimo predicho por el modelo mediante una extracción a las condiciones encontradas. Se realizaron 4 réplicas de este punto para eliminar la mayor variabilidad posible.

OrdenEst	TipoPt	Temperatura [°C]	Presión [atm]	Dosis enzima [U/g]
1	1	46	180	0
2	1	64	180	0
3	1	46	270	0
4	1	64	270	0
5	1	46	180	21
6	1	64	180	21
7	1	46	270	21
8	1	64	270	21
9	-1	40	225	11
10	-1	70	225	11
11	-1	55	150	11
12	-1	55	300	11
13	-1	55	225	-7
14	-1	55	225	29
15	0	55	225	11
16	0	55	225	11
17	0	55	225	11
18	0	55	225	11
19	0	55	225	11
20	0	55	225	11

2.6.2 Caracterización extractos post extracción

Se efectuó una nueva caracterización lignocelulósica con el fin de evaluar los cambios estructurales en la pulpa de café tras los pretratamientos y la extracción.

Los extractos obtenidos por CO_2 supercrítico se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia para determinar la presencia de cafeína, ácidos clorogénicos, teobromina y otros compuestos. El análisis se realizó en un sistema Prominence LC-20AT equipado con detector de arreglos de diodos (PDA, SPD-20AT) a 271 nm, utilizando una columna C18 Agilent Zorbax Eclipse Plus (5 µm, 150 × 4,6 mm) acoplada a una precolumna Zorbax

NH_2 (5 µm, 12,5 × 4,6 mm), a 25 °C, con fase móvil metanol/agua (50:50), flujo de 0,8 mL/min en modo isocrático, volumen de inyección de 10 µL y tiempo de corrida de 10 min.

La cuantificación e identificación de ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El procedimiento comprendió extracción lipídica, derivatización a ésteres metílicos y análisis instrumental. La fracción grasa se obtuvo siguiendo el método Folch modificado, empleando diclorometano/metanol, sonicación, centrifugación, separación de fases y evaporación a 45 °C hasta sequedad. Los lípidos secos se metilaron mediante una mezcla ácido sulfúrico/metanol a 60 °C durante 60 min y los FAME se recuperaron con hexano. El análisis se efectuó en un GC-MS Shimadzu QP2010 con columna DB-WAX, inyección en modo split, rampa de temperatura programada, helio como gas portador y adquisición en modo scan (35–800 m/z). La identificación se basó en tiempos de retención y espectros de masas, empleando el estándar FAME Mix Supelco 37 para construir curvas de calibración y determinar linealidad, LOD y LOQ de cada analito.

3. Capítulo 3: Análisis y discusión de resultados

Este capítulo expone los resultados obtenidos en cada una de las etapas experimentales y su interpretación. Se presentan los hallazgos de la caracterización lignocelulósica inicial, los efectos de los tratamientos enzimáticos y ultrasónicos sobre la matriz de pulpa de café, y la eficiencia de la extracción con fluidos supercríticos. La discusión se orienta a contrastar estos resultados con lo reportado en la literatura y a identificar tendencias relevantes.

3.1 Caracterización lignocelulósica

La caracterización química de la pulpa de café obtenida en este estudio reveló una composición con algunas diferencias respecto a los valores reportados en la literatura. La Tabla 3-1 resume los análisis lignocelulósicos reportados para la pulpa de café, así como los obtenidos en esta tesis.

Se observó un contenido de compuestos liposolubles del 7,12 ± 0,45 %, mientras que la fracción hidrosoluble alcanzó un 46,05 ± 1,12 %, un valor en línea al reportado por Arango-Agudelo et al. [66], quienes encontraron un 48,46 %. La pulpa de café contiene una cantidad significativa de carbohidratos hidrosolubles, principalmente monosacáridos y oligosacáridos derivados de hemicelulosas y pectinas, como arabinosa, galactosa y xilosa [67], [68]. Además, la pulpa es rica en compuestos fenólicos, destacándose los ácidos clorogénicos y sus derivados, los cuales han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes y su contribución al perfil químico del café [69]. Otro compuesto relevante en la fracción hidrosoluble es la cafeína, cuya concentración varía según el método de procesamiento del café.

Tabla 3-1: Caracterización lignocelulósica de pulpa de café.

Parámetro/Autor	Murthy et. al (2012)	Arango-Agudelo et, al. (2023)	Cenicafé (2023)	Dias et al. (2015)	Este trabajo
Liposolubles	-	-	-	-	7,12 ± 0,45
Hidrosolubles	-	48,46	-	-	46,05 ± 1,12
Lignina soluble	-	0,06	-	-	0,16 ± 0,01
Lignina insoluble	17,5	21,22	16,85-17,5	14,3	24,45 ± 1,67
Celulosa	63	58,93	17,7-29,51	20,7	18,6 ± 0,67
Hemicelulosa	2,3	5,29	2,39-5,78	3,6	22,54 ± 1,35
Cenizas	-	0,48	6,44-10,5	-	11,61 ± 0,02

En cuanto a la lignina, la fracción insoluble representó el 24,45 ± 1,67 %, superando los valores reportados por Murthy & Madhava Naidu y otros estudios [66], [70], [71], [72] cuyas estimaciones oscilaron entre 14,3 y 21,22 %. La celulosa presentó un 18,6 ± 0,67 %, lo que contrasta con valores superiores descritos en la literatura, como los 63 % reportados por Murthy & Madhava Naidu [71] y 58,93 % por Arango-Agudelo et al. [66]. La hemicelulosa alcanzó un 22,54 ± 1,35 %, un valor considerablemente mayor al encontrado en otros estudios, los cuales oscilaron entre 2,3 % y 5,78 %. Finalmente, el contenido de cenizas en este estudio fue del 11,61 ± 0,02 %, superando los valores reportados en la literatura, donde los niveles fluctuaron entre 0,48 % y 10,5 %.

Estas diferencias podrían explicarse de acuerdo con los siguientes factores:

- Variedad del cultivo: Los perfiles genéticos de las diferentes variedades de café influyen en la composición lignocelulósica. Para este estudio se utilizó café variedad Castillo.
- Condiciones ambientales: Variables como altitud, temperatura y tipo de suelo impactan en la biosíntesis de compuestos estructurales.
- Prácticas postcosecha: Las técnicas de recolección, secado y almacenamiento pueden propiciar la degradación de estos compuestos lignocelulósicos por acción de microorganismos.

La caracterización inicial de la pulpa de café empleada en este estudio arrojó un contenido de cafeína de 9,493 mg/g de materia seca, valor que se encuentra dentro del rango reportado en la literatura para esta matriz. La caracterización del contenido de cafeína en la pulpa de café muestra variaciones atribuibles a la variedad, el procesamiento y las condiciones de análisis. Rojas-Orduña et al. (2023) evaluaron pulpas de *Coffea arabica* var. Caturra, reportando valores de 8.81 ± 0.18 mg/g y 9.06 ± 0.17 mg/g en muestras de pulpa roja y amarilla, respectivamente, lo que confirma una concentración apreciable de este alcaloide en la biomasa seca [73]. De forma complementaria, Cañas et al. (2022) analizaron la digestión gastrointestinal simulada de la pulpa, registrando un contenido inicial de 5060 µg/g (equivalente a 5.06 mg/g) de cafeína previo a la digestión, lo que aporta información relevante sobre su biodisponibilidad y potencial uso en aplicaciones nutracéuticas [74].

Dentro de las estructuras lignocelulósicas, la hemicelulosa y lignina actúan como barreras físicas que limitan la accesibilidad enzimática y disminuyen la conversión de celulosa. Además, la lignina tiene la capacidad de adsorber irreversiblemente celulasas debido a sus características hidrofóbicas y aromáticas [56]. Esto no solo limita la conversión de celulosa en azúcares fermentables, sino que también afecta la extracción de compuestos bioactivos.

Para superar estas limitaciones, se planteó la combinación de ultrasonido con procesos enzimáticos. Estudios previos, como el realizado por García et al. [75] en olote (parte de la mazorca de maíz una vez que ha perdido los granos) de maíz, han demostrado que el ultrasonido facilita la despolimerización de estructuras lignocelulósicas al romper enlaces hidrofóbicos y aumentar la porosidad de la matriz. Este tratamiento induce cambios estructurales que incrementan la accesibilidad enzimática y favorecen procesos de extracción o degradación posteriores. Este enfoque podría optimizar la extracción de compuestos de interés, como cafeína y azúcares reductores, al tiempo que reduce la necesidad de solventes.

3.2 Aplicación tratamientos enzimáticos y ultrasónicos

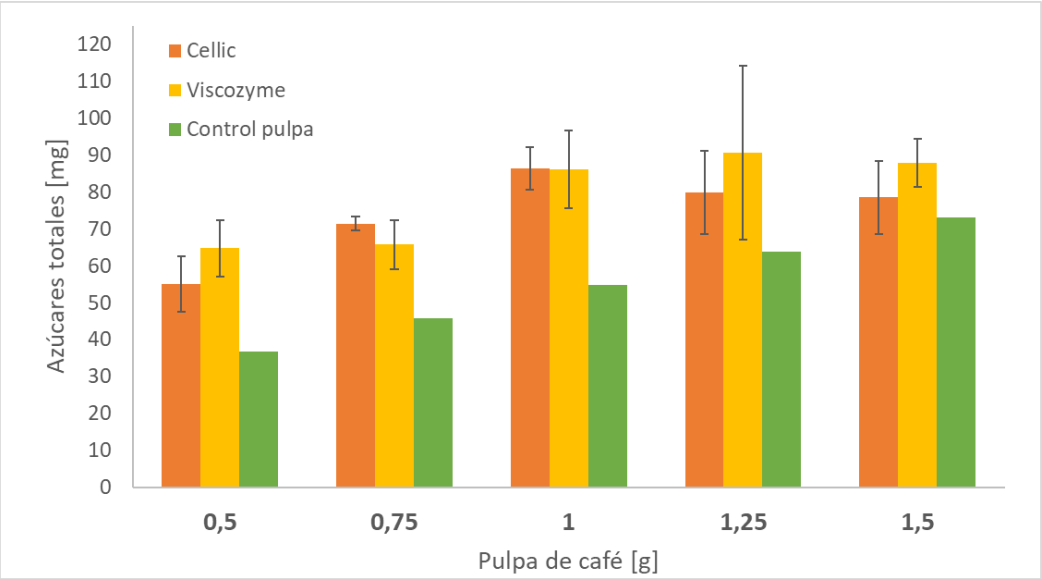
3.2.1 Aplicación de enzimas

En estudios previos se ha demostrado que la pulpa de café constituye una fuente importante de ácidos hidroxicinámicos, principalmente ácido clorogénico y cafeico, los cuales se encuentran en su mayoría esterificados a la pared celular. Torres-Mancera et al. (2011) reportaron un contenido total de 5 276 mg/kg de pulpa seca, con una fracción ligada superior al 70 % en todos los compuestos analizados. Mediante la aplicación de extractos enzimáticos producidos por *Rhizomucor pusillus* en fermentación en estado sólido, en combinación con pectinasa comercial, se alcanzaron rendimientos de extracción de hasta 54,4 % para ácido clorogénico y 19,8 % para ácido ferúlico. Estos resultados evidencian que la acción sinérgica de las enzimas permite una liberación más eficiente de compuestos fenólicos, lo cual no solo incrementa la recuperación de antioxidantes, sino que también constituye una estrategia viable para la valorización de la pulpa de café como subproducto agroindustrial.

En esta investigación, se evaluó el efecto de la dosis enzimática en función de la pulpa de café, utilizando una cantidad constante de 16 U de enzimas (384 µl de Viscozyme, 256 µl Cellic CTeC) y variando la cantidad de sustrato. Se midieron azúcares estructurales (sacarosa, fructosa y glucosa) tanto en la pulpa (referida como control) como en cada punto para determinar el óptimo de la hidrólisis enzimática. Como se observa en la Figura 3-1, tanto con la enzima Cellic como la Viscozyme se nota un comportamiento ascendente en la liberación de azúcares a medida que se disminuye la relación E/S.

El ANOVA de un solo factor permitió evaluar si existen diferencias significativas en la liberación de azúcares entre las dos enzimas analizadas. Los resultados mostraron que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($F = 0,83$; $p = 0,398$), con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Figura 3-1: Curvas dosificación enzimas Cellic CTeC y Viscozyme.



Elaboración propia

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que tanto Cellic como Viscozyme promueven la despolimerización de la matriz lignocelulósica de la pulpa de café, medida a través de la liberación de azúcares en solución. Se observa que la disminución de la relación E/S favorece la liberación de azúcares para ambas enzimas. El análisis de varianza de un solo factor confirma que no existen diferencias significativas en el desempeño de las enzimas, por lo que se decide avanzar hacia la siguiente etapa de experimentación con los puntos de la curva $S_{0,75}$, S_1 y $S_{1,25}$ dado que estos representan los puntos máximos de liberación de azúcares de manera ascendente.

3.2.2 Evaluación de ultrasonido y enzimas

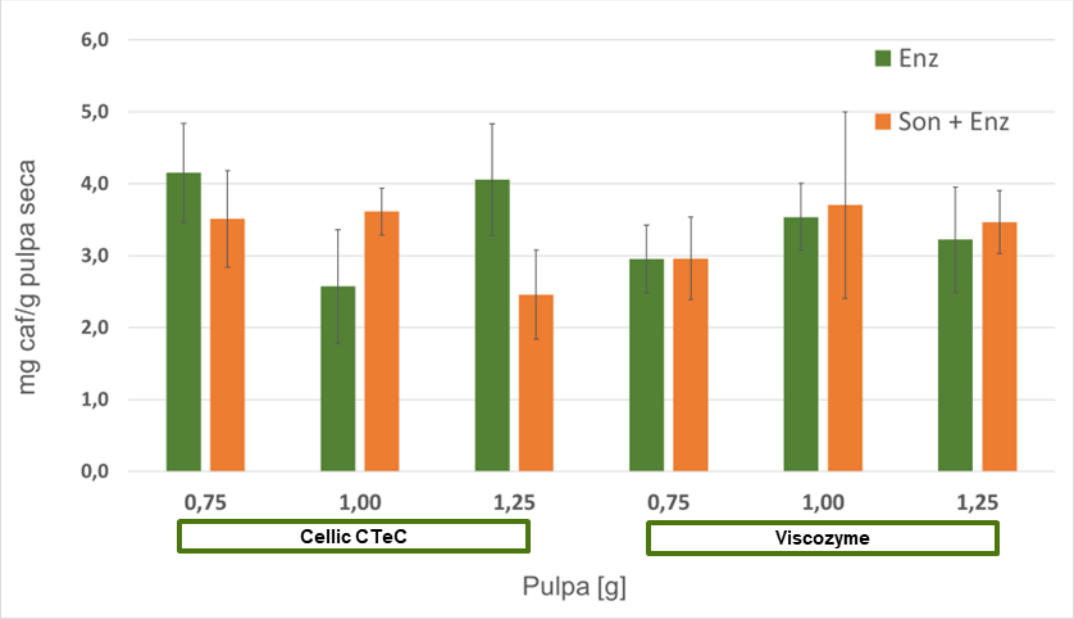
Con los puntos $S_{0,75}$, S_1 y $S_{1,25}$ seleccionados de la curva de dosificación se evalúa la aplicación de ultrasonido como pretratamiento a la hidrólisis enzimática de la pulpa de café, de forma secuencial.

Estudios han demostrado que la aplicación de pretratamientos acoplados a enzimas mejora la conversión de azúcares, lo que indica una mejor acción enzimática para la despolimerización de las cadenas lignocelulósicas presentes en la matriz vegetal. Widjaja

et al. [76] evaluaron un proceso de pretratamiento en dos etapas aplicado a pulpa de café robusta para optimizar la producción de azúcares reductores mediante hidrólisis enzimática. El primer pretratamiento consistió en el uso de ácido sulfúrico diluido (0.2 M), seguido de una etapa organosolv con etanol, catalizada por NaOH, cuyas condiciones óptimas fueron 127 °C, 44.88 minutos y 51.29% v/v de etanol. Bajo estas condiciones, se logró una remoción de hemicelulosa del 86.45% y de lignina del 14.89%, lo cual permitió una mayor exposición de la celulosa amorfa, evidenciada por la reducción del índice de cristalinidad de 17.23% a 16.43%. La posterior hidrólisis enzimática con una mezcla de celulasa y xilanasa, en presencia de Tween 80 como surfactante, generó la mayor concentración de azúcares reductores (2.349 mg/mL), superando en 44.33% al control sin surfactante. Estos resultados confirman que el uso combinado de pretratamientos y la incorporación de surfactantes puede mejorar significativamente la eficiencia en la conversión de residuos lignocelulósicos como la pulpa de café.

Se realizó la medición de cafeína para cada configuración de pretratamiento, con enzima (Enz) y con ultrasonido más enzimas (Son + Enz). Para el punto de máxima liberación de cafeína ($C_{1,25}$), la enzima Cellic CTeC mostró una mayor capacidad para favorecer la liberación de cafeína en comparación con la enzima Viscozyme. El ANOVA de un solo factor confirmó que estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($F = 9,63$; $p = 0,036$; $\alpha = 0,05$), lo que indica que el tipo de enzima influyó de manera determinante en los rendimientos obtenidos, expresados como mg de cafeína por gramo de pulpa. La mayor diferencia de concentración entre los tratamientos se observó en el punto $Cellic_{1,25}$, por lo que se selecciona esta dosis como la indicada para el resto de la experimentación. Los resultados se pueden observar en la Figura 3-2.

Figura 3-2: Comparación sonicación y enzimas vs enzimas.



Elaboración propia

La aplicación de ultrasonido como acople de otras técnicas ha sido estudiada para la pulpa y otros residuos del café. Serna-Jiménez et al. (2023) [77] evaluaron la extracción de cafeína y compuestos fenólicos totales a partir de pulpa de café (Coffea arabica var. Castillo Naranjal), utilizando agua como solvente mediante dos métodos: extracción sólido-líquido convencional (CSLE por sus siglas en inglés) y extracción asistida por ultrasonido (USAE por sus siglas en inglés). A través de un diseño compuesto central, se optimizaron variables como tiempo, temperatura y potencia ultrasónica, logrando con USAE una recuperación máxima de 15.6 g caf/kg de pulpa y 12.4 g de polifenoles/ kg pulpa en base seca, superando ampliamente los valores alcanzados por el método convencional. Además, el consumo energético del proceso con ultrasonido fue significativamente menor, con 116 kJ/g para cafeína y 93 kJ/g para polifenoles, en comparación con los 396 kJ/g y 264 kJ/g registrados en CSLE. La identificación por Cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) reveló la presencia de ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido 5-clorogénico y rutina en los extractos.

En el presente estudio, la aplicación de ultrasonido previa al tratamiento enzimático no generó un aumento en la liberación de cafeína desde la pulpa de café en medio acuoso. Este resultado indica que la combinación secuencial entre cavitación ultrasónica y acción enzimática no fue efectiva para este tipo de compuesto, lo que sugiere una posible limitación en la capacidad del tratamiento para promover una disrupción estructural suficiente que facilite su extracción. Es probable que el ultrasonido haya liberado únicamente la fracción más accesible de cafeína durante su aplicación, sin inducir cambios significativos que mejoraran posteriormente la acción enzimática. Así mismo, la ineficacia del tratamiento ultrasónico podría estar vinculada a las limitaciones técnicas del equipo utilizado. En este trabajo se empleó un baño ultrasónico Branson 1800, con frecuencia fija de 40 kHz y sin control de potencia, lo que impidió ajustar la intensidad acústica necesaria para generar una cavitación suficientemente disruptiva. La distribución no homogénea de energía y la falta de control de temperatura, inherentes a este tipo de equipos, también pudieron restringir la transferencia de masa y la liberación de metabolitos solubles. Estas condiciones contrastan con las reportadas en estudios previos que han demostrado una mayor eficiencia del ultrasonido cuando se dispone de control preciso sobre variables como la potencia, temperatura y tiempo de exposición.

Los resultados de este capítulo muestran que la hidrólisis enzimática es una estrategia efectiva para valorizar la pulpa de café. Cellic CTeC y Viscozyme favorecieron la despolimerización de la matriz lignocelulósica, con una liberación creciente de azúcares, al disminuir la relación enzima/sustrato. Aunque no se hallaron diferencias significativas entre enzimas para los azúcares ($F = 0,83$; $p = 0,398$), sí se evidenciaron diferencias en la liberación de cafeína, donde Cellic CTeC tuvo un mejor desempeño ($F = 9,63$; $p = 0,036$). Así mismo, bajo las condiciones evaluadas, el ultrasonido no constituye una estrategia eficaz para incrementar la liberación de cafeína en combinación con el tratamiento enzimático.

En conclusión, bajo las condiciones evaluadas, la hidrólisis enzimática se consolida como un método viable para incrementar la disponibilidad de azúcares y cafeína en la pulpa de café, mientras que el ultrasonido, en su configuración actual, no constituye una estrategia eficaz para potenciar dicho efecto. Este hecho resalta que la integración de tecnologías físicas y biocatalíticas no siempre produce efectos sinérgicos y que la efectividad del

proceso depende tanto de la naturaleza química del metabolito como de la configuración del sistema. Por lo tanto, la aplicación de ultrasonido en la valorización de la pulpa de café requiere ajustes técnicos más precisos y una evaluación comparativa más amplia para determinar su verdadera contribución en la liberación de compuestos de interés.

3.2.3 Extracción con fluidos supercríticos

Respuesta rendimiento [%]

La variable respuesta analizada es el rendimiento del extracto seco definido como la relación entre el peso del extracto seco y la cantidad de pulpa inicial, expresada en porcentaje, proporciona una medida de la efectividad de la extracción. En la Tabla 3-2 se muestra la matriz de diseño junto con los resultados para la variable respuesta descrita. El valor máximo alcanzado para el rendimiento fue de 4,87% y corresponde a un punto central a 55°C, 225 bar y 11 U/g. Para la creación de la matriz de diseño, así como en los análisis estadísticos se utilizó la herramienta Minitab 19.

Tabla 3-2: Matriz de diseño con variable respuesta Rendimiento

Orden	TipoPt	Temperatura [°C]	Presión [atm]	Dosis enzima [U/g]	Rendimiento [%]
1	1	46	180	0	1,28
2	1	64	180	0	4,82
3	1	46	270	0	0,92
4	1	64	270	0	4,80
5	1	46	180	21,33	1,37
6	1	64	180	21,33	3,02
7	1	46	270	21,33	2,52
8	1	64	270	21,33	2,04
9	-1	40	225	11	2,67
10	-1	70	225	11	4,87
11	-1	55	170	11	3,82
12	0	55	300	11	3,54
13	0	55	225	0	3,59
14	0	55	225	29	4,60
15	0	55	225	11	4,33
16	0	55	225	11	4,87
17	0	55	225	11	3,17

18	-1	55	225	11	4,54
19	-1	55	225	11	4,74
20	-1	55	225	11	3,49

Se realiza un primer (ANOVA) para identificar datos atípicos e interacciones no significativas para el modelo de regresión. Las observaciones 5 y 14 fueron eliminadas debido a su impacto significativo en el ajuste del modelo. Al realizar un análisis de residuos, se identificó que presentaban discrepancias considerables entre el valor observado y el valor ajustado, lo que indicaba que no seguían el patrón general del resto de los datos y las convierten en valores atípicos. Ni el factor Presión ni sus interacciones superaron el umbral de significancia, por lo que fueron eliminados del modelo para esta respuesta, lo que permite un mejor ajuste. Se realizó un segundo ANOVA con los datos e interacciones descartados, cuyos resultados se muestran en las Tablas 3-3 y 3-4, respectivamente. El modelo tiene un desempeño bastante bueno, con un alto $\mathbf{R^2}$ (84,12%) que indica que explica la mayor parte de la variabilidad de los datos. El valor del $\mathbf{R^2_{ajustado}}$ (78,01%) sugiere que el modelo no está sobreajustado y mantiene una buena capacidad explicativa. Sin embargo, el $\mathbf{R^2_{pred}}$ de **59,76%** sugiere que el modelo podría mejorarse para predecir mejor a nuevos conjuntos de datos. La ecuación para el modelo obtenido se presenta en Ecuación 1.

Tabla 3-3: Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	25,7619	5,1524	13,77	0,000
Lineal	2	12,5544	6,2772	16,78	0,000
Temperatura [°C]	1	11,0804	11,0804	29,61	0,000
Dosis enzima [U/g]	1	1,4741	1,4741	3,94	0,069
Cuadrado	2	8,7409	4,3705	11,68	0,001
Temperatura [°C]*Temperatura [°C]	1	0,2467	0,2467	0,66	0,431
Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]	1	7,6390	7,6390	20,42	0,001
Interacción de 2 factores	1	4,8880	4,8880	13,06	0,003
Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]	1	4,8880	4,8880	13,06	0,003
Error	13	4,8639	0,3741		
Falta de ajuste	8	2,4343	0,3043	0,63	0,735
Error puro	5	2,4296	0,4859		
Total	18	30,6259			

Tabla 3-4: Resumen del modelo

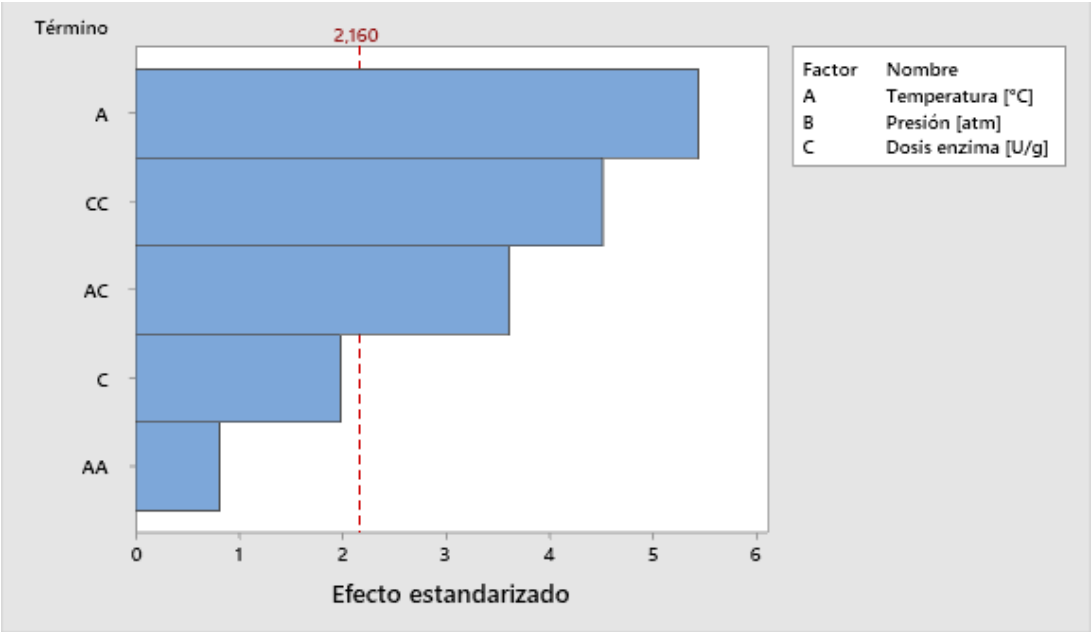
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,611678	84,12%	78,01%	59,76%

Ecuación 1: Modelo de regresión: Rendimiento [%]

Rendimiento [%] = -12,12 + 0,370 Temperatura [°C]
+ 0,653 Dosis enzima [U/g]
- 0,00166 Temperatura [°C]*Temperatura [°C]
- 0,01142 Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]
- 0,00814 Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]

El modelo fue significativo, con un valor-p menor a 0,05. Los factores Temperatura, la interacción cuadrada de la Dosis y la interacción de ambos presentan un valor-p < 0,05 indicando que tuvieron significancia estadística con un nivel de confianza del 95% y por lo tanto explican en su mayoría la variación del rendimiento, como se observa en el Diagrama de Pareto presentado en la Figura 3-3.

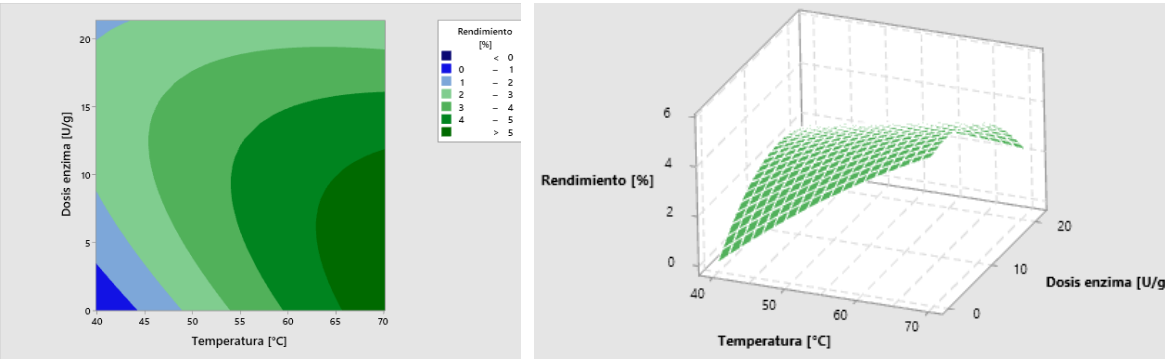
Figura 3-3: Diagrama de Pareto efectos de estandarizados: Respuesta Rendimiento extracción



Elaboración propia

Las gráficas de contorno y superficie de respuesta revelan una curva cóncava hacia abajo con una zona de máximo de rendimiento cerca de la temperatura máxima fijada, así como el intervalo entre 0-10 U/g de dosis enzimática, como se observa en las Figuras 3-4a y 3-4b.

Figura 3-4: a. Gráfico de contornos para rendimiento. b. Superficie de respuesta.

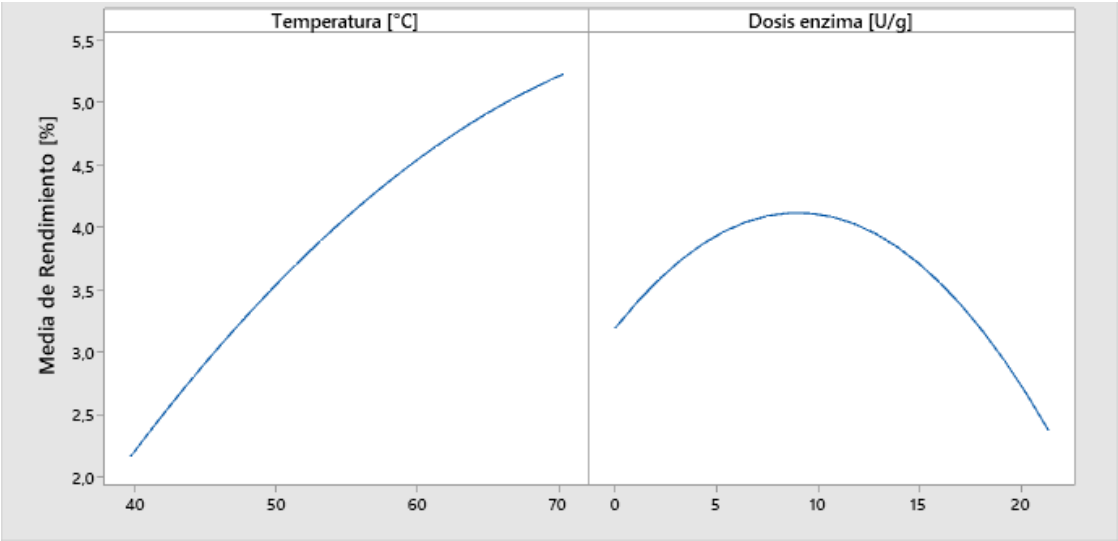


a. b.

Elaboración propia

Como se puede observar en la Figura 3-5, la gráfica factorial de la temperatura indica un comportamiento asintótico de máximo para 70°C, por lo que no se hace necesario un aumento de la temperatura por fuera de los límites establecidos del modelo para alcanzar el óptimo que aumente el rendimiento.

Figura 3-5: Gráficas de efectos principales para Rendimiento



Elaboración propia

Respuesta cafeína en pulpa [mg cafeína/g pulpa]

La variable respuesta analizada es la cafeína en pulpa seca, definida como la relación entre el peso de la cafeína en el extracto y la cantidad de pulpa inicial, expresada como mg de cafeína por gramo de pulpa seca inicial, proporciona una medida de la efectividad de la extracción de cafeína. En la Tabla 3-5 se muestra la matriz de diseño junto con los resultados para la variable respuesta descrita. El valor máximo alcanzado para el porcentaje de cafeína fue de 4,92 mg cafeína/g pulpa y corresponde a un punto a 70°C, 225 bar y 11 U/g.

Tabla 3-5: Matriz de diseño con variable respuesta Cafeína en pulpa

Orden	TipoPt	Temperatura [°C]	Presión [atm]	Dosis enzima [U/g]	Cafeína en pulpa [mg/g pulpa]
1	1	46	180	0	1,50
2	1	64	180	0	1,53
3	1	46	270	0	1,74
4	1	64	270	0	0,87
5	1	46	180	21,33	4,43
6	1	64	180	21,33	0,96
7	1	46	270	21,33	0,78
8	1	64	270	21,33	3,75
9	-1	40	225	11	4,60
10	-1	70	225	11	4,92
11	-1	55	170	11	3,82
12	0	55	300	11	3,92
13	0	55	225	0	2,17
14	0	55	225	29	3,59
15	0	55	225	11	2,89
16	0	55	225	11	3,93
17	0	55	225	11	2,33
18	-1	55	225	11	4,24
19	-1	55	225	11	4,52
20	-1	55	225	11	3,24

Del mismo modo realizado en la variable anterior, se ejecuta un primer ANOVA para identificar datos atípicos e interacciones no significativas para el modelo de regresión. La observación 6 y 12 fueron eliminadas debido a su impacto significativo en el ajuste del modelo. Al realizar un análisis de residuos, se identificó que presentaban discrepancias considerables entre el valor observado y el valor ajustado, por lo que se eliminan para mejorar el modelo. Para este análisis, se eliminó la interacción Temperatura-Presión por su baja significancia para el modelo lo que permite que ajuste mejor. Se realizó un segundo ANOVA con los datos e interacciones descartados, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3-6 y Tabla 3-7 respectivamente. La ecuación para el modelo obtenido se presenta en Ecuación 2.

Tabla 3-6: Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,734791	84,44%	70,61%	38,99%

Tabla 3-7: Análisis de Varianza

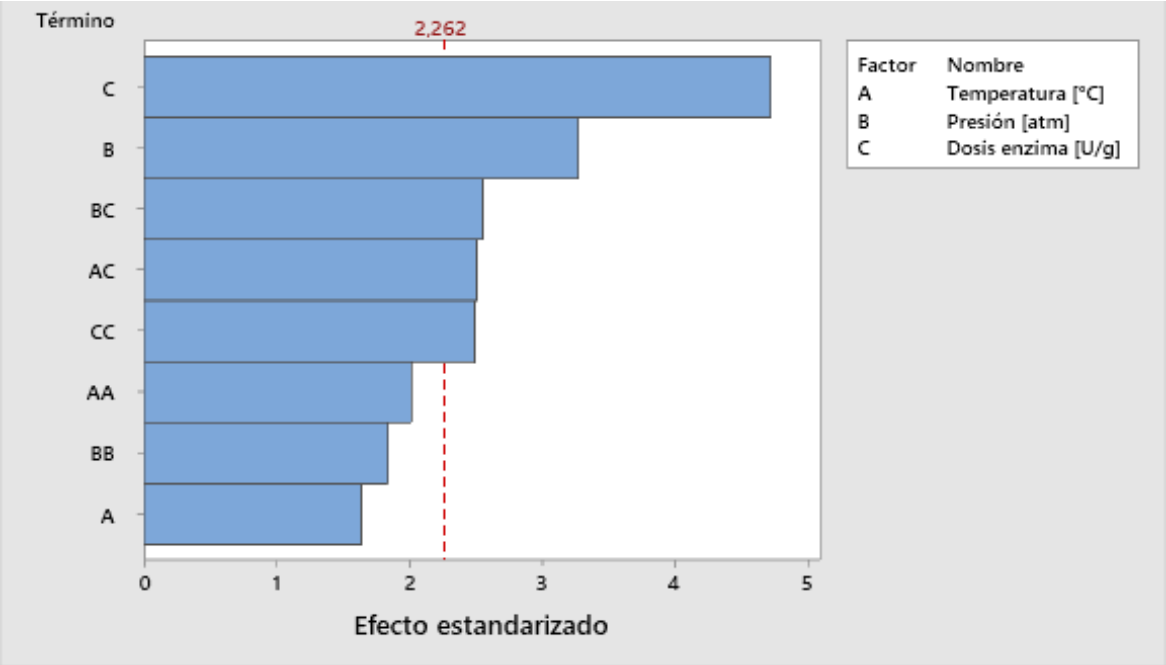
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	26,3710	3,2963	6,11	0,007
Lineal	3	16,3910	5,4637	10,12	0,003
Temperatura [°C]	1	1,4480	1,4477	2,68	0,136
Presión [atm]	1	5,7930	5,7933	10,73	0,010
Dosis enzima [U/g]	1	12,0610	12,0608	22,34	0,001
Cuadrado	3	9,8000	3,2666	6,05	0,015
Temperatura [°C]*Temperatura [°C]	1	2,1950	2,1946	4,06	0,075
Presión [atm]*Presión [atm]	1	1,8340	1,8336	3,40	0,098
Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]	1	3,3580	3,3580	6,22	0,034
Interacción de 2 factores	2	5,6190	2,8093	5,20	0,032
Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]	1	3,4050	3,4054	6,31	0,033
Presión [atm]*Dosis enzima [U/g]	1	3,5170	3,5172	6,51	0,031
Error	9	4,8590	0,5399		
Falta de ajuste	4	1,2810	0,3202	0,45	0,772
Error puro	5	3,5780	0,7157		
Total	17	31,2300			

Ecuación 2: Modelo de regresión cafeína en pulpa [mg/g]

Cafeína en pulpa [mg/g] = 3,6 - 0,593 Temperatura [°C]
+ 0,1415 Presión [atm]
+ 0,162 Dosis enzima [U/g]
+ 0,00499 Temperatura [°C]*Temperatura [°C]
- 0,000321 Presión [atm]*Presión [atm]
- 0,00585 Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]
+ 0,00776 Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]
- 0,001577 Presión [atm]*Dosis enzima [U/g]

El modelo fue significativo, con un valor-p menor a 0,05. Los factores Dosis de enzima, Presión, la interacción entre estas, interacción Temperatura-Dosis y el cuadrado de la Dosis presentaron un valor-p < 0,05 indicando que tuvieron significancia estadística con un nivel de confianza del 95% y por lo tanto explican en su mayoría la variación del rendimiento, como se observa en el Diagrama de Pareto presentado en la Figura 3-6. Si bien las interacciones cuadradas no superaron el nivel de significancia, tienen un valor cercano por lo que no son descartadas, así como el factor Temperatura.

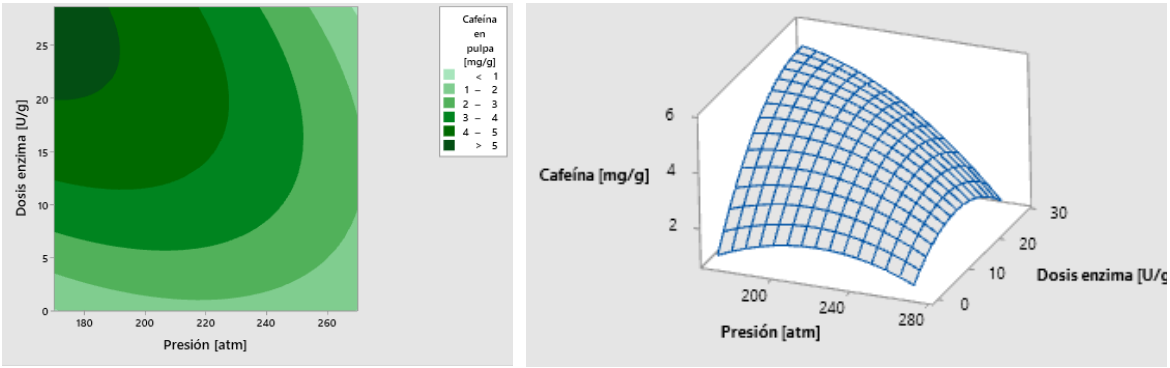
Figura 3-6: Diagrama de Pareto efectos de estandarizados: Respuesta Cafeína en pulpa



Elaboración propia

Las gráficas de contorno y superficie de respuesta revelan una curva cóncava hacia abajo con una zona de máximo de rendimiento cerca de la dosis enzimática máxima fijada, así como el intervalo mínimo de presión trabajado, como se observa en la Figura 3-7a y Figura 3-8b.

Figura 3-7: a. Gráfico de contornos para rendimiento. b. Superficie de respuesta.

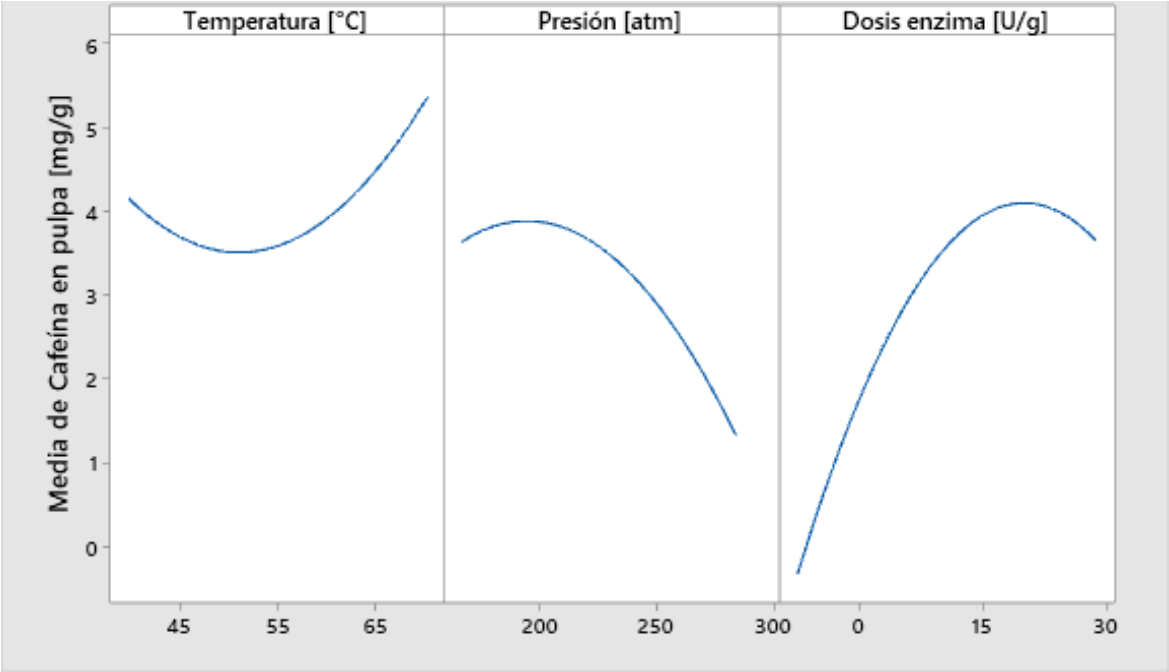


a. b.

Elaboración propia

Como se puede observar en la Figura 3-8, la gráficas factoriales de la Presión y Dosis enzimática indican curvas cóncavas hacia abajo y un comportamiento asintótico, con un máximo de alrededor de 200 bar para la Presión y de 16 U/g para la Dosis. Esto indica que, para los factores significativos del modelo, los valores que maximizan la respuesta se encuentran dentro de la zona de estudio planteada en el diseño experimental.

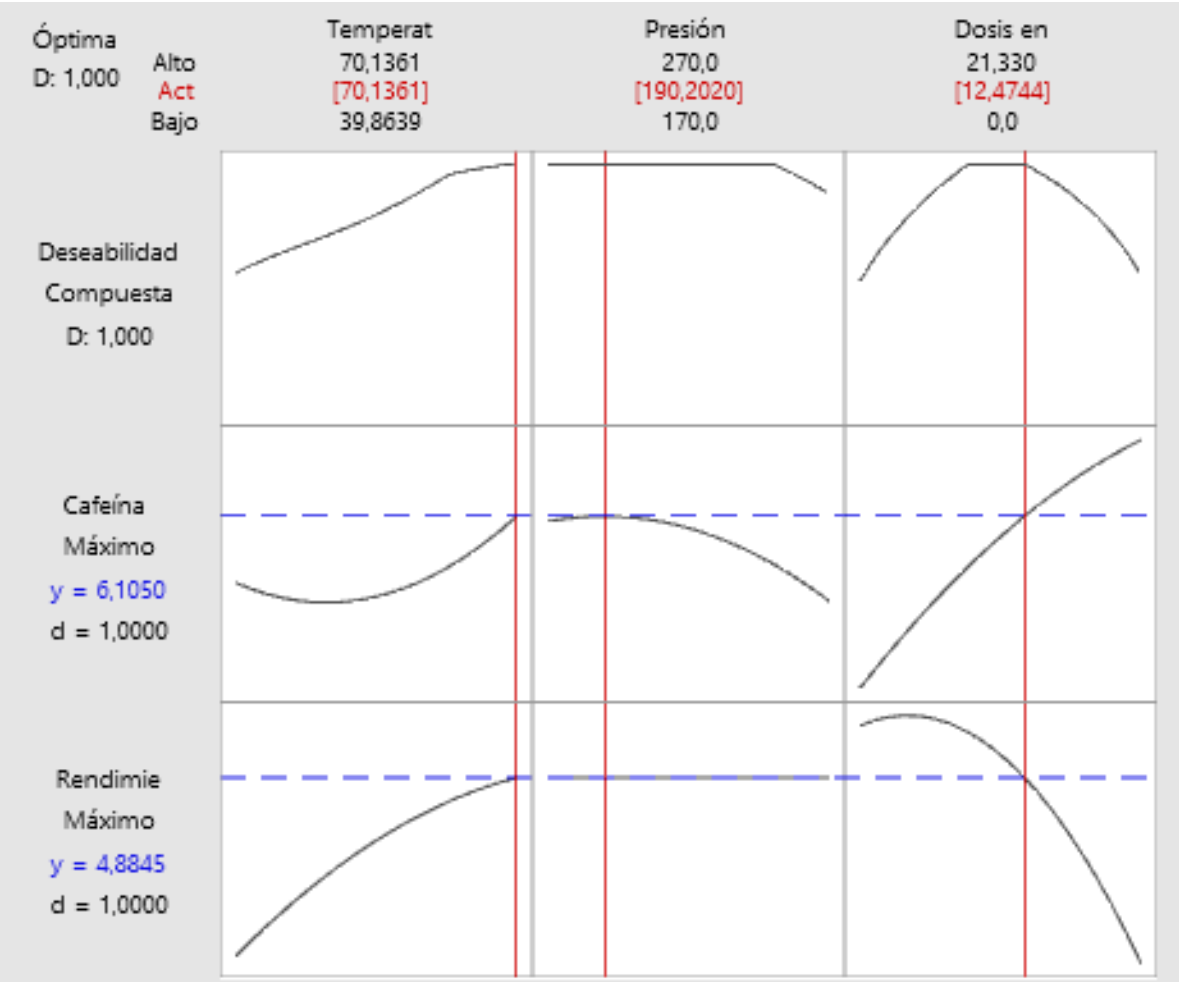
Figura 3-8: Gráficas de efectos principales para Cafeína en pulpa



Elaboración propia

El objetivo de aplicar la hidrólisis enzimática como pretratamiento a la pulpa de café fue maximizar la liberación de cafeína y el rendimiento de extracción. Para ello se evaluaron los modelos generados mediante la metodología de superficie de respuesta, y a partir de ellos se empleó el módulo de optimización de Minitab como se observa en la Figura 3-9. El modelo determinó que los valores óptimos corresponden a 70,1 °C 190 bar de presión y 12,5 U/g de enzima y estima que se alcanzará un rendimiento de 4,88% y 6,1 mg cafeína/g pulpa seca.

Figura 3-9: Resultados optimización de respuestas.



Elaboración propia

La comparación con estudios previos evidencia que la combinación de pretratamiento enzimático y CO_2 supercrítico aplicada en este trabajo incrementó de manera notable la eficiencia de extracción, alcanzando un 62 % de descafeinado del residuo bajo condiciones de temperatura y presión más moderadas. Aunque los granos verdes contienen naturalmente una mayor concentración de cafeína en su matriz, investigaciones previas realizadas sobre este material y sobre subproductos como borra y cascarilla reportan rendimientos limitados incluso al operar a presiones más elevadas y con el uso de co-solventes [17], [18], [25]. En contraste, los resultados obtenidos para pulpa de café demuestran que, pese a partir de una matriz con menor contenido inicial de cafeína, es posible lograr una mayor extracción empleando menores requerimientos energéticos y tiempos de proceso reducidos. Este comportamiento confirma que la despolimerización parcial de la matriz lignocelulósica inducida por el pretratamiento enzimático mejora sustancialmente la disponibilidad del alcaloide y la transferencia de masa, permitiendo que un residuo agroindustrial responda de forma más eficiente al proceso de extracción supercrítica que matrices tradicionalmente estudiadas.

Tabla 3-8: Resultados y otros autores

Autor	Materia prima	Condiciones	Resultado
Azevedo et al. (2007) [18]	Granos verdes	50–60°C, 150–350 bar 1,8 g/min CO_2 + co-solventes	2,06 mg Caf/ g café - Etanol mejor solvente sobre ispropanol
Andrade et al. (2011) [25]	Borra y cascarilla	300 bar, 60°C	Cafeína: 0,684 mg/g Acidos clorogénicos: 0,66–1,13 µg/mg
Menzio et al. (2020)[17]	Granos verdes	75°C, 250 bar, 1 h	0,838 mg Caf/g café - 9 % de descafeinado
		75°C, 250 bar, 1 h + US	2,97 mg Caf/g café - 31 % de descafeinado
		75°C, 250 bar, 4 h + US	5,97 mg Caf/g café - 63 % de descafeinado
Este trabajo	Pulpa de café	70°C, 190 bar, 90 min + E	6,73 mg Caf/g pulpa - 62% descafeinado

3.2.4 Caracterización post extracción

En la caracterización de los extractos se detectó la presencia de teobromina en bajas concentraciones (0,065 mg/g de pulpa seca) lo que indica que su contribución en esta matriz es marginal frente a la cafeína u otros alcaloides. Estudios previos demuestran que, aunque

en el cacao la teobromina puede alcanzar niveles cercanos al 1 %, en el café verde su presencia es significativamente menor, en el orden de 0,02 mg/g [78].

Se identificaron fracciones minoritarias de ácidos grasos, compuestas principalmente por ácidos palmítico (54 %), esteárico (24 %) y linoleico (22 %). El ácido palmítico es uno de los ácidos grasos saturados más abundantes en matrices vegetales y animales, ampliamente empleado en la industria cosmética y alimentaria como agente emulsionante y surfactante. El ácido esteárico, también saturado, se caracteriza por sus propiedades emolientes y espesantes, con aplicaciones que abarcan desde formulaciones cosméticas hasta la fabricación de plásticos y caucho [79]. Por su parte, El ácido linoleico, identificado en un 22 % del perfil de ácidos grasos de los extractos (base área relativa), posee funciones biológicas reconocidas en salud de la piel. Según Wang et al., este ácido graso esencial contribuye a la reparación de la barrera cutánea, presenta propiedades antiinflamatorias, promueve la cicatrización y ofrece fotoprotección, lo que lo convierte en un componente valioso en aplicaciones cosméticas y terapéuticas [80]. Los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado en la literatura. Machado et. al [81] realizaron una caracterización química integral de subproductos del café, incluyendo la pulpa, evaluando parámetros de composición proximal, contenido de metabolitos secundarios y perfil de ácidos grasos. Los autores identificaron que los lípidos representan una fracción minoritaria de la pulpa de café (aproximadamente 1,7 g/100 g base seca), pero con un perfil dominado por ácidos grasos saturados y poliinsaturados. En particular, se destacó la presencia de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico como los componentes más abundantes de la fracción lipídica.

La baja proporción de lípidos detectada puede explicarse por la polaridad del proceso extractivo aplicado, que no resulta afín a compuestos lipofílicos. En consecuencia, los ácidos grasos identificados no representan la totalidad de la fracción lipídica presente en la pulpa de café, sino únicamente aquella que logró solubilizarse bajo las condiciones de extracción empleadas. Para una caracterización más completa del perfil lipídico, sería necesario aplicar métodos de extracción con solventes no polares que favorezcan la recuperación de esta fracción en mayor proporción.

4. Capítulo 4: Alternativas de aprovechamiento para subproductos de extracción

La pulpa de café es un residuo proveniente del beneficio del fruto y representa aproximadamente el 40% en base húmeda de éste. Con una producción para el año cafetero 2024 de aproximadamente 15 millones de sacos de 60 kg equivalentes, se generaron alrededor de 262 mil toneladas de pulpa. Generalmente, estos residuos son mal dispuestos en las fincas cafeteras, donde son transportados y depositados a campo abierto, bajo techo o a la intemperie [82]. En relación con la composición química de la pulpa de café se reporta que está compuesta principalmente por carbohidratos (31 %), fibra (46 %), proteína (9–10 %), lípidos (1–2 %), minerales (6–10 %), celulosa (25 %), hemicelulosa (3 %), lignina (20–31 %), cenizas (6–7 %), polifenoles (8 %) y cafeína (1 %) [83]. Esta composición y en particular por la presencia de compuestos fenólicos, como los taninos, se generan lixiviados durante el proceso de descomposición o compostaje. Los lixiviados pueden actuar como agentes fitotóxicos causando alteración en la microflora edáfica e inhibición de artrópodos benéficos, que son cruciales para mantener la salud del suelo y el ciclo de nutrientes. Así mismo, la acumulación de pulpa de café en cuerpos de agua propicia el incremento en la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), acidificación del medio y elevada concentración de sólidos suspendidos, los cuales pueden generar un fenómeno de eutrofización, reducen la penetración de la luz solar y deterioran la calidad del recurso hídrico, poniendo en peligro la fauna y flora que reside en estos ecosistemas [84], [85].

Tradicionalmente, la pulpa de café se ha destinado a compostaje o como fertilizante orgánico debido a su alto contenido de azúcares y una buena relación carbono:nitrógeno (25-30:1). Además, la facilidad de estos procesos de transformación permite su implementación por los caficultores [82], [86]. Sin embargo, estos usos presentan

limitaciones como la lenta degradación de la lignina y la incapacidad de aprovechar el potencial energético o químico del material.

En este contexto, se menciona que la composición química de la pulpa de café puede variar significativamente acorde a factores intrínsecos al cultivo, prácticas agronómicas, tipo y calidad del suelo, a la variedad de café (Típica, Borbón, Maragopipe, Caturra, Colombia, entre otras), condiciones climáticas, estado de maduración. Esta variabilidad inherente adiciona complejidad al desarrollo de procesos estandarizados para el aprovechamiento del residuo. La pulpa de café ha demostrado ser una fuente rica en compuestos bioactivos, cafeína, celulosa, hemicelulosa, lignina y minerales. Sin embargo, su aprovechamiento requiere de tecnologías de extracción eficientes y rentables, y es un desafío los costos asociados a procesos de transformación y a la necesidad de acoplar y optimizar la escalabilidad industrial de las propuestas. En adición, son pocos los estudios que han analizado sistemáticamente las propiedades fisicoquímicas de la pulpa tras la extracción de compuestos bioactivos, lo que limita el diseño de aplicaciones específicas.

Así, con el objetivo de abordar estos retos, en cumplimiento al objetivo 3: *Proponer alternativas de aprovechamiento para los subproductos generados en la extracción de cafeína*, se lleva a cabo una vigilancia tecnológica para identificar las tendencias y las tecnologías emergentes que nos permitan proyectar una valorización efectiva y sostenible del residuo de pulpa de café procesada por fluidos supercríticos. Estos vacíos, junto con la información recopilada, abren oportunidades para investigar usos innovadores, como la producción de materiales de alto valor agregado o su integración en procesos industriales sostenibles, lo que podría convertir un residuo en un recurso valioso para investigar usos innovadores, como la producción de materiales de alto valor agregado o su integración en procesos industriales sostenibles.

4.1 Caracterización lignocelulósica post-extracción

La caracterización lignocelulósica de la pulpa de café mostró modificaciones notables tras el proceso de extracción. Como se observa en la Tabla 4-1, la fracción liposoluble se registró un incremento de 6,17 ± 1,69 % a 12,43 ± 0,67 %, lo que sugiere que el tratamiento favoreció la liberación de compuestos no polares, posiblemente ácidos grasos, ceras y metabolitos secundarios que tienden a concentrarse en la matriz residual. En contraste, los

compuestos hidrosolubles pasaron de 47,55 ± 2,25 % a 46,05 ± 1,12 %, una variación pequeña que, dada la desviación estándar, puede considerarse no significativa.

Tabla 4-1: Efecto del proceso de fluidos supercríticos sobre la caracterización lignocelulósica de la pulpa de café

Parámetro (%)	Muestra inicial	Muestra post extracción
Liposolubles	6,17	12,43
Hidrosolubles	47,55	46,05
Lignina soluble	0,18	0,04
Lignina insoluble	24,87	26,52
Celulosa	19,53	24,21
Hemicelulosa	23,47	29,26
Cenizas	11,55	3,85

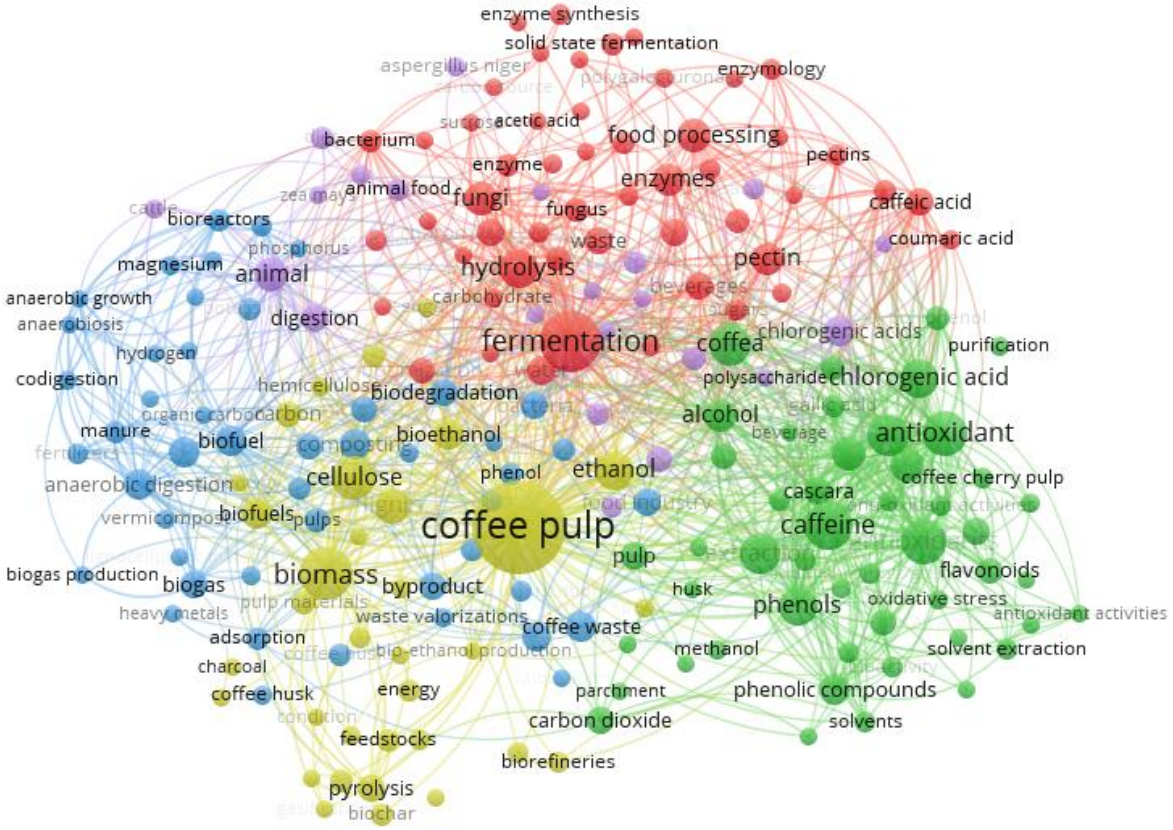
La lignina soluble se mantuvo en niveles cercanos a cero (0,00–0,03 %), sin variación tras el proceso. La lignina insoluble mostró un aumento de 24,87 ± 1,39 % a 26,52 ± 0,14 %, lo que refleja un enriquecimiento relativo de esta fracción como consecuencia de la remoción de compuestos más fácilmente extraíbles. De forma similar, la celulosa y la hemicelulosa aumentaron de 19,53 ± 1,68 % a 24,21 ± 2,65 % y de 23,47 ± 1,87 % a 29,26 ± 3,63 %, respectivamente. Aunque los incrementos se acompañan de desviaciones notables, los resultados sugieren que la matriz residual posterior a la extracción se encuentra relativamente más enriquecida en carbohidratos estructurales posiblemente por la acción enzimática sobre ellas y la intensidad del proceso extractivo.

Finalmente, la fracción de cenizas presentó una reducción marcada, de 11,55 ± 0,10 % a 3,85 ± 0,13 %, lo que indica una eliminación significativa de minerales solubles durante el proceso extractivo. En conjunto, estos resultados muestran que el proceso de extracción no solo permitió la recuperación de compuestos de interés, sino que también modificó la composición del residuo, concentrando fracciones lignocelulósicas estructurales y reduciendo de forma clara el contenido mineral.

4.2 Análisis bibliométrico de aplicaciones de la pulpa de café

La pulpa de café ha sido objeto de múltiples investigaciones que buscan su valorización en diversos campos. Para identificar las principales tendencias de investigación, se realizó un análisis bibliométrico de la literatura disponible en la base de datos Scopus, utilizando la siguiente ecuación de búsqueda *(coffee) AND (Pulp) AND (waste OR extraction OR adsorbent OR energy OR biofuels OR fuels OR food OR catalyst OR composites OR pyrolysis OR materials OR nano)*. A partir de los términos más frecuentes en los títulos y resúmenes de 450 artículos publicados entre 2010 y 2025, se generó un mapa de palabras que sintetiza las áreas de estudio predominantes, usando la herramienta VosViewer, como se observa en la Figura 4-1.

Figura 4-1: Mapa de palabras generado para aplicaciones de la pulpa de café.



Elaboración propia

El mapa de palabras se divide en tres zonas principales, identificadas por colores que reflejan diferentes enfoques de investigación:

- **Zona azul y amarilla, Procesos Biotecnológicos y Energía:** agrupa términos relacionados con la transformación de la pulpa de café en fuentes de energía renovable. Los tópicos "biomass", "biodegradation", "biofuel" y "pyrolysis" establecen a la pulpa como un recurso rico en carbohidratos y materia orgánica, adecuado para ser procesado mediante métodos termoquímicos, generando productos como carbón sólido (biochar), combustible líduido (bio-oil) y gas de síntesis (syngas) o procesos biológicos de degradación de los componentes lignocelulósicos, como la hidrólisis con enzimas o microorganismos para producción de azúcares y finalmente biocombustibles.
- **Zona verde, Compuestos Bioactivos y Extracción:** agrupa términos como "caffeine", "phenolic compounds", "antioxidant activities" y "solvent extraction", relacionados con la identificación, extracción y caracterización de compuestos bioactivos presentes en la pulpa de café, enfocado en las propiedades funcionales como antioxidantes y estimulantes.
- **Zona roja, Procesamiento Alimentario y Residuos:** contiene términos como "food processing", "pectin", "coumaric acid", "chlorogenic acid" y "coffee waste", que refleja el interés en aprovechar la pulpa de café en la industria alimentaria, aprovechando su composición nutricional y alto contenido en compuestos comunes en los alimentos, como la pectina, un polisacárido presente en la pulpa (5-15% en peso seco) y componente clave por sus propiedades gelificantes y estabilizantes, ampliamente utilizado en productos como mermeladas, yogures y confitería.

4.3 Usos potenciales:

Una vez realizada la extracción de compuestos de interés, la pulpa de café continúa representando una fuente rica en biomoléculas y estructuras lignocelulósicas con potencial de aprovechamiento. A pesar de haber sido sometida a tratamientos intensivos, esta matriz conserva propiedades fisicoquímicas que pueden ser aprovechadas. En esta sección se presentan las principales líneas de valorización propuestas para la pulpa de café tratada, con énfasis en aplicaciones como:

4.3.1 Adsorbentes:

El aprovechamiento de residuos lignocelulósicos como materiales adsorbentes ha sido un tema de creciente interés debido a su bajo costo, disponibilidad y eficacia en la remoción de contaminantes presentes en soluciones acuosas. En este contexto, la pulpa de café post-extracción incluso tras tratamientos con solventes, conserva una estructura porosa rica en celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual le confiere propiedades adsorbentes favorables, especialmente para la retención de metales pesados.

Diversos estudios han evaluado su desempeño sin necesidad de tratamientos fisicoquímicos adicionales. Por ejemplo, en condiciones óptimas de tamaño de partícula de 180 µm, concentración de 20 g/L, agitación a 100 RPM, temperatura ambiente y tiempos de contacto de 90 a 105 minutos, se logró una eficiencia de remoción de 93,26 % para Cr(III) y de 74,80 % para Cr(VI) [87], [88]. De forma similar, para el caso del Mn(II), bajo condiciones de pH óptimo de 4, agitación a 100 RPM y tiempo de contacto de 90 minutos, la remoción alcanzó un 53,40 %, con una capacidad máxima de adsorción de 8,01 $mg \cdot g^{-1}$. El proceso se ajustó al modelo cinético de pseudo-segundo orden de Ho y McKay, y presentó una isoterma de adsorción de tipo Langmuir [89].

Además, la pulpa de café ha mostrado capacidad de regeneración como adsorbente. En particular, el uso de H_2SO_4 0,10 M permitió desorber 66,84 % de Cr(III) y 45,75 % de Cr(VI), en periodos de 9 y 5 días, respectivamente, manteniendo condiciones de agitación constante (100 RPM) y temperatura ambiente. Estos resultados indican que la pulpa de café post-extracción puede cumplir con características comparables a materiales adsorbentes convencionales, posicionándola como una opción viable para tratamiento de efluentes [88], [89]. El Achaby et al. [90], reporta aumentos significativos en el área superficial específica de la pulpa después de tratamientos químicos, desde 0,0186 m²/g en la pulpa cruda (Raw -Coffee Pulp: R-CP), hasta 0,4973 m²/g en la muestra tratada con álcalis (Alkali Treated -Coffee Pulp: AT-CP), alcanzando un máximo de 1,0181 m²/g en fibras puras de celulosa de escala micrométrica (CMFs en inglés). Este proceso inicia con la molienda del R-CP hasta un tamaño de partícula de 2 mm, seguido por un lavado con agua destilada a 60 °C durante una hora. Posteriormente, la muestra se trata tres veces con una solución de NaOH al 4 % a 80 °C durante dos horas, obteniendo AT-CP. Esta se somete a un proceso de blanqueo con un tampón acetato (27 g de NaOH y 75 mL de ácido

acético glacial diluidos a 1 L) y clorito de sodio al 1,7 % durante dos horas a 80 °C. El producto resultante es un gel blanco altamente hidratado compuesto por CMFs.

Este aumento en el área superficial está asociado a la eliminación de compuestos no celulósicos, que expone una mayor superficie activa para interacciones moleculares. Como aplicación demostrativa, las CMFs obtenidas fueron utilizadas como adsorbente para la remoción de azul de metileno (MB) en soluciones acuosas concentradas a pH neutro. Los resultados mostraron una alta eficiencia de adsorción, alcanzándose el equilibrio en 90 minutos. Los datos cinéticos se ajustaron al modelo de pseudo-segundo orden y las isotermas fueron descritas adecuadamente por el modelo de Freundlich. La capacidad máxima de adsorción fue de 182,5 mg/g, valor superior al reportado para otros adsorbentes basados en celulosa [90].

Otra vía destacada de valorización de la pulpa de café consiste en su conversión en carbón activado (AC). En un estudio reciente [91], se prepararon ACs a partir de pulpa de café utilizando distintas proporciones de activante (Na_2HPO_4) y controlando la temperatura del proceso. Las proporciones pulpa/Na_2HPO_4 de 4:1, 2:1, 5:4 y 1:1 permitieron obtener carbones activados con áreas superficiales específicas de 140, 150, 450 y 440 m²/g, respectivamente. El material preparado con una proporción 5:4 mostró un desempeño superior en la remoción de colorantes orgánicos como azul de metileno (MB), rojo directo (DR) y fenol, alcanzando capacidades máximas de adsorción de aproximadamente 150, 120 y 120 mg/g, respectivamente, valores incluso superiores a los obtenidos con carbones activados comerciales. Estos resultados evidencian que es posible obtener un AC con una elevada cantidad de mesoporos, grupos oxigenados en superficie y buena afinidad por moléculas polares y de gran tamaño.

La pulpa tratada químicamente también ha demostrado ser un material adsorbente eficaz para la remoción de metales pesados en soluciones acuosas. Carvajal-Flórez et al. [92] reportan que, al someter la pulpa a un tratamiento químico con ácido fosfórico seguido de carbonización térmica a 600 °C, mejora significativamente su capacidad adsorbente. Este material fue evaluado para la eliminación de iones Cu^{2+} y Pb^{2+} en soluciones sintéticas que simulan lixiviados de rellenos sanitarios. Los resultados indicaron una alta eficiencia de remoción, alcanzando hasta un 74,17 % para Pb^{2+} y 67,40 % para Cu^{2+} en soluciones individuales. En mezclas binarias, el desempeño fue aún mayor, con tasas de eliminación

de hasta 97,91 % para Pb^{2+} y 70,42 % para Cu^{2+}. El proceso de adsorción se ajustó a un modelo cinético de segundo orden, lo que sugiere un mecanismo dominado por quimisorción, acompañado por una difusión intraparticular hacia los poros internos del adsorbente.

4.3.2 Pellets

Dentro de las estrategias de producción de combustibles sólidos la pulpa de café ha sido objeto de diversas investigaciones orientadas a su valorización energética. Cubero-Abarca et al. [93] evaluaron la factibilidad de fabricar briquetas y pellets a partir de pulpa de café *(Coffea arabica*), mediante procesos de secado, compactación y caracterización energética. Los resultados indicaron que, tras un secado adecuado, reduciendo el contenido inicial de humedad del 90 % a un nivel del 12-15 %, los pellets alcanzaron un poder calorífico de 12.501 kJ/kg, mientras que las briquetas lograron 11.591 kJ/kg. Aunque estos valores se sitúan por debajo de los estándares europeos para biomasa comercial, representan una opción viable para generación de calor en contextos locales. Los pellets mostraron mayor densidad aparente (1300 kg/m³) y mejor resistencia mecánica horizontal, mientras que las briquetas ofrecieron mayor resistencia a cargas verticales. Sin embargo, se identificaron desafíos como el elevado contenido de cenizas (6,74 % en pellets y 8,68 % en briquetas) y la absorción de humedad, factores que pueden afectar la durabilidad y el rendimiento en combustión.

4.3.3 Producción de biocombustibles (bioetanol, biogás, hidrógeno)

Dentro de las rutas más maduras y estudiadas**,** la producción de bioetanol a partir de pulpa de café ha sido ampliamente explorada como alternativa para valorizar este residuo agroindustrial. Diversos estudios han destacado el potencial fermentativo de los extractos y pretratamientos aplicados. Menezes et al. [94] demostraron que el extracto acuoso de pulpa de café puede ser utilizado en fermentación directa, logrando concentraciones de etanol cercanas a 70 g/L cuando se combina con jugo de caña o melaza, y 42 g/L cuando se fermenta extracto de café puro, evidenciando que los polifenoles presentes no inhiben significativamente la actividad de *Saccharomyces cerevisiae*. Widjaja et al. [95] emplearon un pretratamiento Organosolv con etanol al 50 %, que permitió reducir la lignina residual a 0,2 % p/p y mejorar la accesibilidad de la celulosa y hemicelulosa, alcanzando un

rendimiento de 0,065 g etanol/g de glucosa + xilosa tras la fermentación con diversas cepas de levaduras y bacterias. Gurram et al. [96] modelaron la producción de bioetanol a escala industrial a partir de pulpa de café pretratada con ácido diluido y enzimas comerciales, proyectando una producción de 1050 toneladas/día de etanol a partir de 10000 toneladas/día de pulpa, con un balance energético neto positivo (32,2 MJ/L de etanol) y beneficios ambientales asociados. Shenoy et al. [97] evaluaron diferentes residuos lignocelulósicos, incluyendo pulpa de café seca y húmeda, logrando rendimientos de hasta 0,46 g etanol/g de azúcar reducida con fermentación ácida y posterior neutralización. El estudio de Sadhukhan et al. [98], mediante un análisis comparativo económico-ambiental, posiciona a la pulpa de café entre los sustratos más favorables ambientalmente, aunque con costos de producción de etanol más elevados (2,87 USD/gal) en comparación con otras biomasas. Finalmente, Orrego et al. [99] optimizaron y escalaron la fermentación del mucílago de café —fracción rica en azúcares simples— obteniendo un rendimiento del 94 % del teórico (0,47 g etanol/g de azúcares) en biorreactores de 5 L sin requerir pretratamientos ni nutrientes adicionales, demostrando así la viabilidad técnica y económica de este proceso a escala industrial.

De manera complementaria, la valorización de la pulpa de café mediante digestión anaerobia para la producción de biogás ha sido objeto de múltiples investigaciones recientes, evidenciando su potencial como fuente renovable de energía. Chala et al. [100] evaluaron el potencial metanogénico de residuos de procesamiento de café en Etiopía, obteniendo rendimientos específicos de metano de hasta 294,5 L/kg de sólidos volátiles (VS por sus siglas en inglés) a partir de mucílago y 244,7 L/kg VS de pulpa, destacando la necesidad de co-digestión y suplementación de oligoelementos para mejorar la estabilidad del proceso. En esta línea, Selvankumar et al. [101] optimizaron la producción de biogás mediante co-digestión de pulpa de café pretratada con álcalis (NaOH al 1%) y estiércol bovino, alcanzando una producción máxima de 144 mL CH_4/kg en condiciones optimizadas de temperatura (40 °C) e incubación. De forma complementaria, Corro et al. [102] demostraron que la co-digestión de pulpa de café y estiércol en condiciones mesofílicas incrementa progresivamente la proporción de metano en el biogás (de 50 % a 60 %), aunque señalaron la necesidad de controlar emisiones postcombustión de compuestos trazas potencialmente peligrosos. En otro artículo Corro et al. [103] propusieron un pretratamiento fotocatalítico (10 % Cu/TiO_2 bajo radiación solar) que mejora significativamente la degradación de lignocelulosa en la pulpa de café, lo que se traduce en

una mayor conversión anaerobia y un incremento notable en la generación de metano y otros hidrocarburos combustibles.

Por otra parte, la producción de hidrógeno a partir de residuos de café ha emergido como una ruta prometedora para valorizar energéticamente este subproducto. Miñón-Fuentes & Aguilar-Juárez [104] evaluaron la fermentación oscura de pulpa de café en reactores discontinuos, alcanzando una producción de 49,2 mL H_2/g DQO y una densidad energética de 0,045 MJ/kg de pulpa fresca. El proceso demostró una buena biodegradabilidad del sustrato y un rendimiento comparable al de otros residuos complejos, aunque limitado por la presencia de compuestos recalcitrantes como la lignina. En línea con estos hallazgos, Villa Montoya et al. [105] optimizaron la producción de hidrógeno mediante el uso de pretratamientos hidrotermales y co-digestión de pulpa, cáscara y aguas residuales de café. Su estudio reveló que el pretratamiento moderado (factor de severidad ~3.5) y la bioaumentación con un consorcio microbiano autóctono incrementaron hasta 7 veces la producción de H_2 respecto a los residuos no tratados, alcanzando un máximo de 8 mL H_2/batch reactor. Además, la combinación de residuos sólidos y líquidos permitió equilibrar la relación C/N y reducir los efectos inhibitorios de los polifenoles y furfurales.

La pulpa de café se confirma como un subproducto agroindustrial con alto potencial para la producción de biocombustibles. En el caso del biogás, los estudios señalan rendimientos de metano superiores a 240 L CH_4/kg VS, lo que ubica a este proceso como la alternativa más madura y consolidada. La facilidad de integración en sistemas ya existentes y la posibilidad de mejorar la estabilidad del proceso mediante co-digestión lo convierten en una opción viable de aprovechamiento inmediato para la pulpa de café.

Por otro lado, la producción de hidrógeno constituye una vía emergente con gran proyección como vector energético limpio. Aunque los rendimientos actuales (≈49 mL H_2/g DQO) son todavía modestos, la aplicación de pretratamientos ha demostrado incrementar significativamente la productividad, posicionando a la pulpa de café como un recurso competitivo frente a otras biomasas. En este sentido, mientras el biogás ofrece la alternativa más inmediata, el hidrógeno representa una apuesta estratégica de largo plazo para la transición hacia sistemas energéticos más sostenibles.

4.3.4 Pirólisis

Diversos estudios han explorado el aprovechamiento de los residuos de café mediante procesos termoquímicos para la producción de biocombustibles. En este contexto, la pirólisis ha emergido como una de las rutas más estudiadas, especialmente en la valorización de la pulpa de café. Este proceso consiste en la descomposición térmica de la biomasa en ausencia de oxígeno, generalmente en un rango de 300 a 600 °C, que provoca la ruptura de enlaces en los componentes lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina) y genera tres fracciones principales: bio-oil, biochar y gases no condensables (CO, CO_2, H_2, CH_4). A nivel térmico, la degradación de hemicelulosa y carbohidratos inicia entre 150 y 200 °C, mientras que la celulosa y proteínas se descomponen principalmente entre 200 y 350 °C, y la lignina presenta una degradación más amplia y progresiva a lo largo de todo el proceso [106].

Un estudio sobre la valorización de biomasa mexicana, que incluye la pulpa de café, a través de pirólisis, indica que, aunque este residuo presenta un mayor impacto ambiental debido a la liberación de metano y dióxido de carbono, sigue siendo una opción viable desde el punto de vista financiero, especialmente cuando se compara con otras biomasa como el aserrín de pino. La pulpa de café tiene un alto contenido de celulosa (41-64%) y hemicelulosa (27-35%), lo que la hace adecuada para procesos como la pirólisis y la gasificación. Sin embargo, su alta humedad es un desafío para su manejo, ya que requiere un pretratamiento de secado antes de su conversión [107].

Mendoza Martínez et al. [108] realizaron un análisis sobre diferentes rutas termoquímicas para la valorización de residuos de café en Brasil, incluyó la evaluación de procesos como la pirólisis, gasificación, hidrotermal carbonización y torrefacción. En este estudio, se concluyó que la pulpa de café, rica en celulosa y hemicelulosa, es adecuada para procesos como la pirólisis y la gasificación. Estos procesos permiten la producción de biochar (alta porosidad y superficie específica le confieren utilidad como mejorador de suelos y como sumidero de carbono, favoreciendo la retención de agua y nutrientes) y bioaceite (combustible en calderas y motores adaptados, o servir como materia prima para procesos de refinación orientados a la producción de biocombustibles de segunda generación). La gasificación, por ejemplo, mostró ser particularmente adecuada para residuos con alto contenido de hemicelulosa, como la cáscara de café, produciendo una alta cantidad de gas

de síntesis (syngas), una mezcla compuesta principalmente por monóxido de carbono (CO), hidrógeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4), junto con trazas de hidrocarburos ligeros. La pulpa de café, por su parte, mostró un gran potencial para la producción de bioetanol debido a su contenido en azúcares fermentables como glucosa y xilosa. Además, los granos defectuosos de café, que contienen un alto contenido de lípidos, han demostrado ser adecuados para la producción de biodiesel. En general, se considera que los residuos de café tienen un alto potencial para la producción de biocombustibles y bioproductos, contribuyendo a la sostenibilidad del sector y reduciendo el impacto ambiental de estos residuos.

4.3.5 Alimentación animal

La pulpa de café ha demostrado un notable potencial como ingrediente en la alimentación animal, tanto para rumiantes como para aves de corral, gracias a su alto contenido de fibra, proteínas y carbohidratos. Costa et al. [109] reportaron un contenido total de 63,5 mg/g de aminoácidos en base seca y 0,96 mg/g de aminoácidos libres, siendo los más abundantes la hidroxiprolina, el ácido glutámico, el ácido aspártico y la leucina. Además, se detectó la presencia de todos los aminoácidos esenciales, que representaron alrededor del 37 % del total.

Munguía-Ameca et al. [110] evaluaron la inclusión de pulpa de café ensilada en la dieta de corderos, observando una mejora del 12 % en la eficiencia alimentaria y un aumento en la ganancia diaria de peso (ADG por sus siglas en inglés). Este resultado sugiere que la pulpa de café puede ser una alternativa viable a forrajes tradicionales, especialmente en regiones con acceso limitado a fuentes de alimento de alta calidad. No obstante, cuando la inclusión superó el 20 % de la dieta, la ingesta disminuyó en un 15 %, lo que se atribuye a la presencia de compuestos bioactivos como la cafeína y los polifenoles, con posibles efectos antinutricionales.

Asimismo, otro estudio [111] evaluó el efecto de extractos de pulpa de cereza de café en dietas para pollos de engorde (broilers) y reportaron un aumento del 20 % en la ganancia diaria de peso, junto con una mejor conversión alimenticia (FCR pro sus siglas en inglés) y una reducciónn en el uso de antibióticos. También se documentó una mejora significativa

en la morfofisiología intestinal, incluyendo el aumento de la altura de las vellosidades. En la misma línea, Huanhong et al. [112] reportaron mejoras en la digestibilidad y en la relación altura de vellosidades/profundidad de criptas intestinales en aves alimentadas con pulpa de café, indicando un efecto positivo sobre la salud digestiva.

En adición analizaron la co-digestión de pulpa de café extruida con otros ingredientes en dietas para broilers [113]. Encontraron que la sustitución de hasta un 25 % de harina de trigo no afectó el rendimiento animal y, al contrario, mejoró la eficiencia digestiva y la morfología intestinal. Estos hallazgos refuerzan la viabilidad del uso de pulpa de café como insumo alternativo para reducir costos en la producción animal, sin comprometer el crecimiento ni la salud de los animales.

4.3.6 Propiedades bioactivas y nutricionales

La pulpa de café se caracteriza por su alto contenido nutricional y sus propiedades bioactivas, lo que la convierte en un ingrediente valioso para el desarrollo de productos alimenticios funcionales. Según Gil-Ramírez et al. [114], la pulpa de café contiene 10.63% de proteínas, 45.67% de carbohidratos y 36.07% de fibra cruda, lo que la hace un excelente recurso para enriquecer alimentos y mejorar su valor nutricional. Además, la pulpa de café posee propiedades antioxidantes significativas debido a su contenido de ACG, que se ha demostrado que aumenta en un 30% durante la fermentación [115]. Este compuesto es conocido por sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes, lo que la convierte en una opción ideal para desarrollar productos funcionales que promuevan la salud digestiva y metabólica.

La pulpa de café se caracteriza por un perfil rico en compuestos antioxidantes, destacándose los ácidos fenólicos (ácido clorogénico, cafeico, ferúlico, p-cumárico, protocatecuico y gálico), así como diversos flavonoides como quercetina, rutina, catequina y epicatequina. También se han identificado taninos condensados (proantocianidinas) y melanoidinas generadas en procesos de secado, además de alcaloides como la cafeína y la teobromina que aportan actividad antioxidante secundaria. Estos metabolitos contribuyen de manera significativa a la capacidad de la pulpa para neutralizar radicales libres y a su potencial aplicación como fuente natural de compuestos bioactivos en la industria alimentaria y farmacéutica [68], [71].

Además de sus propiedades antioxidantes, un estudio reportado por Bashir y otros colaboradores [116] demostró que los extractos de pulpa de café tienen efectos positivos en la regulación del metabolismo, reduciendo los niveles de glucosa en sangre en un 20% en ratones. Este hallazgo sugiere que la pulpa de café podría ser utilizada como un ingrediente en suplementos alimenticios dirigidos a la prevención y tratamiento de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2. Los ratones tratados también mostraron mejoras en su resistencia a la insulina y en la función hepática, lo que subraya los beneficios potenciales de la pulpa de café para la salud humana.

En términos de seguridad alimentaria, la evaluación realizada por Turck et al. [117] concluyó que la pulpa de café es segura para el consumo humano cuando se controla el contenido de cafeína. El estudio establece que las bebidas a base de pulpa de café pueden tener un contenido de cafeína de hasta 0.3 mg/mL, lo que es seguro para la mayoría de los consumidores, siempre que no se excedan los 300 mg de cafeína al día. Esto respalda la viabilidad de usar la pulpa de café en la formulación de productos alimenticios como mermeladas, bebidas o barras energéticas, con un riesgo mínimo para la salud.

La pulpa de café está siendo cada vez más utilizada como ingrediente en productos alimenticios funcionales, como barras energéticas, bebidas probióticas y té, gracias a su capacidad para enriquecer los productos con fibra dietética y propiedades antioxidantes. En este sentido, un estudio [118] desarrolló una barra energética que incorporó 20% de pulpa de café junto con 50% de cereales y 30% de panela. Esta formulación proporcionó un contenido energético de 365.21 kcal/100 g, lo que la hace ideal para el consumo de personas que necesitan una fuente rápida de energía. Los análisis microbiológicos de la barra energética confirmaron que el producto es seguro para el consumo humano, sin presentar crecimiento microbiano ni contaminación por patógenos.

La pulpa de café también ha sido utilizada en la creación de bebidas funcionales. Se utilizó en la fermentación de bebidas probióticas con kéfir [119], mejorando su perfil antioxidante y creando un producto con propiedades probióticas que favorecen la salud digestiva. Hay investigaciones [120] donde se mostró que las infusiones de cáscara tienen un perfil sensorial agradable, con un sabor suave y afrutado, y son bien aceptadas en mercados que buscan bebidas funcionales y naturales.

4.3.7 Materiales

El aprovechamiento de la pulpa de café también ha sido explorado en el campo de la biotecnología, específicamente como soporte de probióticos. En este contexto, la pulpa de café liofilizada fue funcionalizada con teobromina y utilizada para inmovilizar *Lactobacillus rhamnosus* en condiciones simuladas gastrointestinales [121]. El estudio mostró que la inmovilización en estos biomateriales mejoró la viabilidad celular tanto en almacenamiento como en condiciones de pH ácido, lo que abre nuevas posibilidades para la creación de biomateriales a partir de residuos de café para aplicaciones en alimentos funcionales. La adición de teobromina, en particular, parece haber favorecido la inmovilización de las bacterias, incrementando la capacidad de adsorción de las células en comparación con otros métodos tradicionales.

En relación con la utilización de la pulpa de café en la creación de películas biodegradables, se han realizado investigaciones sobre la extracción de pectina de la pulpa de café para la producción de películas combinadas con quitosano, un biopolímero con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Estas películas mostraron propiedades mecánicas mejoradas y una mayor resistencia al agua cuando se usó pectina de pulpa de café en comparación con pectina extraída de mucílago de café, lo que sugiere que la estructura de la pulpa de café proporciona una matriz más robusta y flexible para el desarrollo de materiales de empaque activos [122]. Además, el uso de estos materiales biocompuestos puede reducir la dependencia de plásticos derivados del petróleo y promover la economía circular en la industria del café.

A nivel estructural, la pulpa de café ha sido utilizada para desarrollar nanocelulosa, la cual es particularmente útil como refuerzo en matrices poliméricas. En un estudio [123] sobre la preparación de nanocelulosa a partir de la pulpa de café, se demostró que, mediante tratamientos alcalinos y de blanqueo seguidos de hidrólisis ácida, se obtenía nanocelulosa con un diámetro promedio de 16 nm. Esta nanocelulosa se incorporó a una matriz de polivinil alcohol (PVA), mejorando significativamente las propiedades mecánicas, térmicas y ópticas del material compuesto, lo que hace de la nanocelulosa de pulpa de café un candidato ideal para aplicaciones en empaques biodegradables y otros productos de alto rendimiento.

Además de su uso como refuerzo en polímeros, la pulpa de café ha sido aprovechada para desarrollar hidrogeles, materiales con una alta capacidad de absorción de agua y propiedades biocompatibles. En un estudio [124] realizado sobre hidrogeles basados en celulosa de pulpa de café, se observó que estos materiales presentaban una estructura porosa que permitía una notable capacidad de hinchamiento, lo que los hacía aptos para aplicaciones biomédicas como apósitos para heridas. Estos hidrogeles fueron fabricados mediante la combinación de celulosa de pulpa de café con alginato y pectina, y se demostraron biocompatibles y no tóxicos, lo que abre posibilidades para su uso en la medicina regenerativa.

Finalmente, la pulpa de café también ha sido utilizada en el desarrollo de películas a base de pectina, las cuales se combinaron con bacterias y extractos lipofílicos de los residuos de café [125]. Las películas resultantes presentaron una mejor flexibilidad, resistencia mecánica y menor solubilidad en agua en comparación con las películas de pectina de mucílago, lo que resalta la importancia de la pulpa de café en la mejora de las propiedades de los materiales biocompuestos. Este enfoque no solo contribuye a la valorización de los residuos de café, sino que también ofrece una solución sostenible frente al uso de plásticos convencionales, alineándose con los objetivos de la economía circular.

4.4 Biorefinería

La implementación del concepto de biorefinería en el aprovechamiento de la pulpa de café ha ganado interés como una estrategia integral para transformar este residuo lignocelulósico en productos de valor agregado dentro de un marco de sostenibilidad y economía circular. La pulpa representa cerca del 40 % del peso del fruto de café y posee una composición rica en carbohidratos, fibras solubles e insolubles, proteínas, minerales y compuestos bioactivos como polifenoles y cafeína. Král et. al [126] proponen la aplicación de un modelo de biorefinería que permita el fraccionamiento secuencial de la biomasa para la obtención de ingredientes funcionales aplicables en alimentos, cosméticos o suplementos, evitando su disposición no controlada y mitigando sus impactos ambientales adversos.

En línea con este enfoque, Serna-Jiménez y colaboradores [127] presentan un análisis técnico sobre diferentes estrategias de valorización de los residuos del procesamiento primario del café, incluida la pulpa, subrayando que esta puede ser integrada en esquemas de biorefinería mediante procesos como extracción supercrítica, producción de biocombustibles, bioadsorbentes y biopolímeros. El estudio reporta que es posible alcanzar una eficiencia de extracción de cafeína del 84 % utilizando CO_2 supercrítico a 300 bar y 373 K, lo que resalta la viabilidad del uso de tecnologías limpias. Además, se identifican extractos fenólicos con contenido de hasta 17,4 mg GAE/L, lo que refuerza el potencial antioxidante del residuo. Los autores consideran que el desarrollo de estos procesos a escala piloto e industrial debe estar acompañado de evaluaciones económicas y ambientales para consolidar modelos circulares en territorios productores de café.

Desde una perspectiva más enfocada en ingredientes bioactivos, Rebollo-Hernanz et al. [128] proponen un esquema escalonado de biorefinería en el que se prioriza la obtención de nutracéuticos e ingredientes funcionales a partir de la pulpa. Su revisión integra fases de caracterización química, aplicación de tecnologías de extracción verde, validación de actividad biológica y formulación de productos alimentarios. Aunque no presentan datos experimentales, compilan evidencia suficiente para respaldar que este subproducto contiene fibra dietaria, ácidos fenólicos y cafeína, todos con potencial para integrarse en la industria de alimentos funcionales, siempre que el proceso se diseñe bajo principios de sostenibilidad y eficiencia energética.

Finalmente, en la investigación de Hughes y colaboradores [129]se aborda la valorización de la pulpa de café dentro de un modelo de biorefinería multietapa, que combina rutas bioquímicas y termoquímicas. En este sistema, los azúcares presentes en la biomasa son fermentados con *Kluyveromyces marxianus* para producir etanol, mientras que el residuo restante puede ser utilizado para la producción de proteínas microbianas mediante *Yarrowia lipolytica*. Posteriormente, los residuos residuales se destinan a pirólisis catalítica para obtener compuestos aromáticos. Aunque los rendimientos en esta etapa fueron relativamente bajos (5–9 % en peso), el estudio demuestra la posibilidad de integrar diferentes procesos en cascada para maximizar el aprovechamiento del residuo en todas sus fracciones. Este enfoque posiciona a la biorefinería no solo como una alternativa

tecnológica, sino como un marco operativo para transformar los pasivos ambientales del café en recursos industriales multifuncionales.

En conclusión, la pulpa de café representa un recurso versátil con alto potencial para ser transformado en productos de valor agregado mediante enfoques tecnológicos sostenibles. Diversas investigaciones han demostrado su aplicabilidad en la obtención de biocompuestos, nanomateriales, hidrogeles, películas biodegradables, bioadsorbentes y compuestos funcionales, con usos que abarcan desde el tratamiento de aguas hasta la industria del empaque, la biotecnología y los alimentos. Estos avances confirman que los residuos de la cadena cafetera no solo pueden contribuir a la sostenibilidad ambiental, sino que también abren nuevas posibilidades para el desarrollo de materiales innovadores y de alto rendimiento.

El enfoque de biorefinería ofrece un marco técnico integral para consolidar esta transformación, al permitir el fraccionamiento y aprovechamiento secuencial de la biomasa a través de rutas bioquímicas, fisicoquímicas y termoquímicas. Desde la extracción de compuestos bioactivos como cafeína y polifenoles, hasta la producción de bioetanol, biomasa proteica, biochar o energía térmica, las distintas estrategias permiten maximizar el uso de cada fracción del residuo, reduciendo la necesidad de disposición final y cerrando flujos de materia.

Este modelo multifuncional no solo permite una gestión más eficiente de los residuos sólidos del café, sino que también impulsa la creación de nuevas cadenas de valor, especialmente en territorios rurales donde la descentralización de los procesos puede favorecer economías locales. Además, posibilita el reemplazo progresivo de insumos derivados del petróleo por soluciones basadas en biomasa, fortaleciendo la transición hacia una economía circular.

No obstante, para que la biorefinería aplicada a la pulpa de café tenga un impacto real, se requiere una visión sistémica que articule investigación, desarrollo tecnológico, escalamiento industrial y criterios de sostenibilidad ambiental y económica. Más allá de una tecnología específica, la biorefinería debe entenderse como una plataforma estratégica

para enfrentar los retos estructurales de la agroindustria cafetera, al transformar un residuo abundante en un recurso clave para la innovación y la resiliencia productiva.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La aplicación de procesos enzimáticos hidrolíticos demostró ser una estrategia eficaz para incrementar la liberación de azúcares solubles. Aunque el análisis estadístico indicó que no existieron diferencias significativas entre Cellic CTeC y Viscozyme en la producción de azúcares ($F = 0,83$; $p = 0,398$), ambas mostraron un comportamiento ascendente a medida que disminuyó la relación enzima/sustrato, siendo S0,75, S1 y S1,25 los puntos más favorables. En cuanto a la cafeína, los resultados del ANOVA confirmaron diferencias significativas entre las enzimas ($F = 9,63$; $p = 0,036$), con un mejor desempeño de Cellic CTeC frente a Viscozyme. El punto Cellic1,25 se identificó como la condición óptima para maximizar la liberación de cafeína en medio acuoso.

Por el contrario, la aplicación de ultrasonido previo al tratamiento enzimático no produjo un aumento adicional en la liberación de cafeína. Bajo las condiciones evaluadas (baño ultrasónico Branson 1800, frecuencia fija de 40 kHz y sin control de potencia), no se alcanzó un efecto sinérgico con la acción enzimática. Este resultado contrasta con lo reportado en la literatura y sugiere que la ausencia de control sobre variables críticas como potencia, temperatura y distribución de energía limitó la eficiencia del proceso.

La evaluación de la extracción de cafeína con CO_2 supercrítico asistida por pretratamientos enzimáticos permitió establecer que la hidrólisis enzimática favorece significativamente la accesibilidad y recuperación del compuesto. El diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta permitieron identificar condiciones óptimas teóricas de operación,

bajo las cuales se alcanzó un 62 % de descafeinado de la pulpa de café empleando temperaturas, presiones y tiempos de extracción más moderados que los reportados para matrices convencionales. Aunque la extracción no alcanzó rendimientos comparables a los de técnicas convencionales aplicadas a granos verdes, incluso partiendo de una matriz con menor contenido inicial de cafeína, este estudio resalta el valor del proceso como una alternativa verde para la valorización de la pulpa de café. El uso de CO_2 supercrítico aporta ventajas clave: es un solvente inocuo, reutilizable y ambientalmente seguro, capaz de obtener cafeína con alta pureza sin requerir etapas adicionales de purificación. En este sentido, más que por el porcentaje de recuperación, la relevancia de la técnica radica en su selectividad, eficiencia operativa y sostenibilidad, posicionándola como una herramienta viable para el desarrollo de procesos orientados a la obtención de productos de valor agregado bajo criterios ambientales.

La pulpa de café se confirmó como una matriz con potencial para la recuperación de compuestos de interés, tanto carbohidratos estructurales como metabolitos bioactivos. La caracterización lignocelulósica de la pulpa de café evidenció que, tras el proceso de extracción con fluidos supercríticos, el residuo se enriquece en fracciones estructurales como celulosa y hemicelulosa y presenta una reducción significativa en el contenido de cenizas. Estos cambios otorgan a la matriz condiciones más favorables para su uso en procesos de bioconversión y valorización. El incremento relativo de celulosa y hemicelulosa respalda su potencial como sustrato en la producción de bioetanol, biogás y otros biocombustibles, mientras que la disminución de cenizas mejora la eficiencia de rutas termoquímicas y enzimáticas. De forma paralela, la duplicación de la fracción liposoluble sugiere nuevas oportunidades para la recuperación de compuestos de interés industrial, como ácidos grasos y ceras. La revisión del estado del arte confirma que la pulpa post-extracción puede integrarse en múltiples líneas de valorización, desde la producción de adsorbentes y carbones activados para tratamiento de aguas, hasta el desarrollo de materiales biodegradables, alimentos funcionales y suplementos para alimentación animal. Bajo un enfoque de biorefinería, este subproducto se consolida como un recurso versátil capaz de generar bioactivos, combustibles y materiales avanzados, contribuyendo a la sostenibilidad ambiental y a la creación de nuevas cadenas de valor en la agroindustria cafetera.

5.2 Recomendaciones

- **Optimización de pretratamientos enzimáticos:** Profundizar en el estudio de diferentes combinaciones enzimáticas, dosis y tiempos de reacción para mejorar la liberación de cafeína y azúcares estructurales, así como evaluar la estabilidad enzimática en condiciones variables de pH y temperatura.
- **Uso de ultrasonido con control de parámetros:** Repetir los ensayos de integración de ultrasonido y enzimas empleando equipos con control de potencia, temperatura y frecuencia, con el fin de evaluar de manera precisa el efecto de la cavitación acústica sobre la disrupción de la matriz lignocelulósica y la liberación de metabolitos.
- **Escalado de la extracción supercrítica:** Validar el pretratamiento enzimático acoplado a la extracción con CO_2 supercrítico en equipos piloto e industriales, con un mayor control de variables de presión, temperatura y flujo de co-solventes, lo que permitiría confirmar la viabilidad técnica y económica del proceso.
- **Aprovechamiento integral del residuo post-extracción:** Avanzar en la valorización de la pulpa tratada a través de rutas complementarias como la producción de bioetanol, biogás y biopolímeros, aprovechando su enriquecimiento en celulosa y hemicelulosa y la reducción de cenizas.
- **Evaluación de impacto ambiental y económico:** Incorporar análisis de ciclo de vida (ACV) y estudios de costo-beneficio en escenarios de escalamiento industrial, con el fin de determinar la sostenibilidad integral del proceso y su potencial de implementación en territorios cafeteros.
- **Perspectiva de biorrefinería:** Integrar los resultados en un modelo de biorrefinería que contemple la extracción de compuestos bioactivos, la conversión energética y la producción de biomateriales, priorizando siempre tecnologías limpias y principios de economía circular.

Bibliografía

[1] F. M. Damatta, C. P. Ronchi, M. Maestri, and R. S. Barros, “Ecophysiology of coffee growth and production,” *Braz. J. Plant Physiol*, vol. 19, no. 4, pp. 485–510, 2007, doi: https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000400014.

[2] R. Velásquez, “Guía de variedades café en Guatemala,” *Asociación Nacional del Café, Anacafé*, 2019.

[3] D. Echeverri, L. Buitrago, F. Montes, I. Mejía, and M. del P. Gonzáles, “CAFÉ PARA CARDIÓLOGOS COFFEE FOR CARDIOLOGISTS,” *Revista Colombiana de Cardiología*, vol. 11, no. 8, pp. 357–365, Mar. 2005.

[4] Federación Nacional de Cafeteros, “Manual del cafetero colombiano,” *Editorial Argra*, 1958, Accessed: Oct. 29, 2023. [Online]. Available: https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/831

[5] Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, “Informe del Gerente 90 Congreso Nacional de Cafeteros,” Bogotá, Colombia, Nov. 2022. Accessed: Oct. 29, 2023. [Online]. Available: https://federaciondecafeteros.org/

[6] Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, “Guía ambiental para el sector cafetero: 6. Descripción del proceso productivo y del beneficio del café.”

[7] Comité de cafeteros de Antioquia, “Conozca las cifras más relevantes de la Caficultura en Colombia,” Conozca las cifras más relevantes de la Caficultura en Colombia. Accessed: Oct. 29, 2023. [Online]. Available: https://fncantioquia.org/conozca-las-cifras-mas-relevantes-de-la-caficultura-en-colombia/

[8] L. G. y B. Comité de Cafeteros del Cesar, “Comité de Cafeteros del Cesar, La Guajira y Bolívar.”

[9] Federación Nacional de Cafeteros, “Informes comités departamentales 2012,” 2012, *Bogotá*. Accessed: Oct. 08, 2023. [Online]. Available: https://federaciondecafeteros.org/static/files/Informe_Comites_2012.pdf

[10] P. Ghosh and N. Venkatachalapathy, “Processing and Drying of Coffee-A Review,” 2014. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/269986518

[11] N. Rodriguez Valencia, J. R. Sanz Uribe, C. E. Oliveros Tascón, and C. A. Raírez Gómez, “Beneficio del café en Colombia,” 2015. Accessed: Oct. 10, 2023. [Online]. Available: https://es.scribd.com/embeds/60505537/content

[12] A. Parra-Coronado, O. L. García-Navarrete, F. A. Vanegas-Izquierdo, J. A. Gamboa-Gamboa, A. F. González-Mora, and D. A. Ramírez-González, “Preliminary study of drying of natural coffee by cyclical pressure changes,” *DYNA (Colombia)*, vol. 87, no. 214, pp. 53–60, 2020, doi: 10.15446/DYNA.V87N214.83414.

[13] Federación Nacional de Cafeteros, “Estadísticas cafeteras.” [Online]. Available: https://federaciondecafeteros.org/wp/estadisticas-cafeteras/

[14] N. Rodríguez, V. ; Diego, A. Zambrano, F. ; César, and A. Ramírez Gómez, “Manejo y disposición de los subproductos y de las aguas residuales del beneficio del café,” *Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura*, vol. 3, pp. 111–136, 2013, doi: 10.38141/cenbook-0026_31.

[15] R. A. Buffo and C. Cardelli-Freire, “Coffee flavour: An overview,” Mar. 2004. doi: 10.1002/ffj.1325.

[16] K. Speer and I. Kölling-Speer, “The lipid fraction of the coffee bean,” 2006.

[17] S. M. F. Bessada, R. C. Alves, and M. B. P. P. Oliveira, “Coffee silverskin: A review on potential cosmetic applications,” Mar. 01, 2018, *MDPI AG*. doi: 10.3390/cosmetics5010005.

[18] R. Campos-Vega, G. Loarca-Piña, H. A. Vergara-Castañeda, and B. Dave Oomah, “Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects,” 2015, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.tifs.2015.04.012.

[19] T. M. Pacheco, S. Torrez Álvarez, and G. R. Almanza, “Cuantificación de compuestos bioactivos en cáscara de Coffea Arábica en Bolivia,” *Revista Boliviana de Química*, vol. 35, no. 5, pp. 117–126, 2018, Accessed: Apr. 10, 2024. [Online]. Available: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602018000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=es

[20] P. Vitaglione *et al.*, “Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides 1-3,” *J Nutr*, vol. 137, pp. 2043–2048, 2007, doi: https://doi.org/10.1093/jn/137.9.2043.

[21] Y. Semaming, P. Pannengpetch, S. C. Chattipakorn, and N. Chattipakorn, “Pharmacological properties of protocatechuic acid and its potential roles as complementary medicine,” 2015, *Hindawi Publishing Corporation*. doi: 10.1155/2015/593902.

[22] H. Morishita and M. Ohnishi, “Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds,” *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 25, 2001.

[23] G. A. Spiller, *Caffeine*. CRC Press, 1998.

[24] PubChem, “Caffeine.” Accessed: Sep. 14, 2025. [Online]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine

[25] V. Kumar and G. A. Ravishankar, “Current trends in producing low levels of caffeine in coffee berry and processed coffee powder,” *Food Reviews International*, vol. 25, no. 3, pp. 175–197, Jul. 2009, doi: 10.1080/87559120802458099.

[26] M. J. Arnaud, “The pharmacology of caffeine,” 1987. doi: 10.1007/978-3-0348-9289-6_9.

[27] M. Bakherad, A. Keivanloo, E. Moradian, A. H. Amin, R. Doosti, and M. Armaghan, “Practical and efficient synthesis of tetrahydrobenzo[b]pyran using caffeine supported on silica as an ionic liquid solid acid catalyst,” *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 15, no. 12, pp. 2811–2819, Dec. 2018, doi: 10.1007/s13738-018-1468-y.

[28] B. Wang, L. Qin, T. Mu, Z. Xue, and G. Gao, “Are Ionic Liquids Chemically Stable?,” May 24, 2017, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00594.

[29] E. Hataminejad and A. Ezabadi, “Design and exploration of caffeine-based Brönsted acidic ionic liquid (CaffBAIL) for the synthesis of DHPMs, xanthenediones, and acridinediones,” *Research on Chemical Intermediates*, vol. 48, no. 6, pp. 2535–2556, Jun. 2022, doi: 10.1007/s11164-022-04724-7.

[30] M. Salami and A. Ezabadi, “Synthesis of the nano-magnetic ionic liquid based on caffeine and its catalytic application in the synthesis of xanthenes,” *Research on Chemical Intermediates*, vol. 46, no. 10, pp. 4611–4626, Oct. 2020, doi: 10.1007/s11164-020-04224-6.

[31] M. Bakherad, A. Keivanloo, E. Moradian, A. H. Amin, R. Doosti, and M. Armaghan, “Practical and efficient synthesis of tetrahydrobenzo[b]pyran using caffeine supported on silica as an ionic liquid solid acid catalyst,” *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 15, no. 12, pp. 2811–2819, Dec. 2018, doi: 10.1007/s13738-018-1468-y.

[32] P. P. Salvi, A. M. Mandhare, A. S. Sartape, D. K. Pawar, S. H. Han, and S. S. Kolekar, “An efficient protocol for synthesis of tetrahydrobenzo[b]pyrans using amino functionalized ionic liquid,” *Comptes Rendus Chimie*, vol. 14, no. 10, pp. 878–882, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.crci.2011.02.007.

[33] G. Singh, M. Kaur, H. Kaur, and T. S. Kang, “Synthesis and complexation of a new caffeine based surface active ionic liquid with lysozyme in aqueous medium:

Physicochemical, computational and antimicrobial studies," *J Mol Liq*, vol. 325, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.molliq.2020.115156.

[34] S. Dalvand, S. Yaghoubi, S. Morteza Mousavi-Khoshdel, and H. Ghafuri, "Investigating the application of caffeine-based ionic liquid modified by zinc bromide as an effective electrode in supercapacitor," *J Energy Storage*, vol. 44, p. 103323, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.est.2021.103323.

[35] J. Azmir *et al.*, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review," *J Food Eng*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.

[36] K. Ramalakshmi and B. Raghavan, "Caffeine in coffee: Its removal. Why and how?," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 39, no. 5, pp. 441–456, 1999, doi: 10.1080/10408699991279231.

[37] Sigma Aldrich, "Ficha de datos de seguridad diclorometano."

[38] Sigma Aldrich, "Ficha de datos de seguridad acetato de etilo."

[39] M. Silvarolla B., P. Mazzafera, and L. Fazuoli C., "A naturally decaffeinated arabica coffee," *Nature*, vol. 429, no. 6994, pp. 826–826, 2004.

[40] R. J. (Ronald J. Clarke and O. G. Vitzthum, *Coffee : recent developments*. Blackwell Science, 2001.

[41] J. A. Quintero-Jaramillo, J. I. Carrero-Mantilla, and N. R. Sanabria-Gonzalez, "A review of caffeine adsorption studies onto various types of adsorbents," 2021, *Hindawi Limited*. doi: 10.1155/2021/9998924.

[42] G. G. Lenzi *et al.*, "Caffeine adsorption onto Bentonite clay in suspension and immobilized," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 63, 2020, doi: 10.1590/1678-4324-2020180637.

[43] M. Herrero, J. A. Mendiola, A. Cifuentes, and E. Ibáñez, "Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications," Apr. 2010. doi: 10.1016/j.chroma.2009.12.019.

[44] B. A. Shintaku and M. Meireles, "OBTAINING EXTRACT FROM THE RESIDUE OF THE SUGARCANE AND ALCOHOL INDUSTRY USING SUPERCRITICAL CO 2," 2013. [Online]. Available: https://cabidigitallibrary.org

[45] J. B. Hannay and J. Hogarth, "VI. On the solubility of solids in gases," *Proceedings of the Royal Society of London*, vol. 29, no. 196–199, pp. 324–326, Dec. 1879, doi: 10.1098/rspl.1879.0054.

[46] H. Peker, M. P. Srinivasan, J. M. Smith, and B. J. Mccoy, "Caffeine Extraction Rates from Su percritical Carbon Coffee Beans with Dioxide," *AIChE Journal*, vol. 38, no. 5, pp. 761–770, 1992.

[47] S. MacHmudah, K. Kitada, M. Sasaki, M. Goto, J. Munemasa, and M. Yamagata, “Simultaneous extraction and separation process for coffee beans with supercritical CO2 and water,” *Ind Eng Chem Res*, vol. 50, no. 4, pp. 2227–2235, Feb. 2011, doi: 10.1021/ie101252w.

[48] A. Vandeponseele, M. Draye, C. Piot, and G. Chatel, “Subcritical water and supercritical carbon dioxide: Efficient and selective eco-compatible solvents for coffee and coffee by-products valorization,” Dec. 21, 2020, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d0gc03146a.

[49] J. Menzio, A. Binello, A. Barge, and G. Cravotto, “Highly-efficient caffeine recovery from green coffee beans under ultrasound-assisted SC-CO2 extraction,” *Processes*, vol. 8, no. 9, Sep. 2020, doi: 10.3390/pr8091062.

[50] A. B. A. De Azevedo, P. Mazzafera, R. S. Mohamed, S. A. B. Vieira De Melo, and T. G. Kieckbusch, “Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical CO2 and co-solvents,” vol. 25, no. 03, pp. 543–552, [Online]. Available: www.abeq.org.br/bjche

[51] H. Içen and M. Gürü, “Effect of ethanol content on supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes,” *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 55, no. 1, pp. 156–160, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.supflu.2010.07.009.

[52] J. Tello, M. Viguera, and L. Calvo, “Extraction of caffeine from Robusta coffee (Coffea canephora var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide,” *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 59, pp. 53–60, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.supflu.2011.07.018.

[53] K. S. Andrade, R. T. Gonalvez, M. Maraschin, R. M. Ribeiro-Do-Valle, J. Martínez, and S. R. S. Ferreira, “Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition,” *Talanta*, vol. 88, pp. 544–552, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.talanta.2011.11.031.

[54] D. V. Bermejo, E. Ibáñez, G. Reglero, and T. Fornari, “Effect of cosolvents (ethyl lactate, ethyl acetate and ethanol) on the supercritical CO2 extraction of caffeine from green tea,” *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 107, pp. 507–512, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.supflu.2015.07.008.

[55] U. Kopcak and R. S. Mohamed, “Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures,” *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 34, no. 2 SPEC. ISS., pp. 209–214, 2005, doi: 10.1016/j.supflu.2004.11.016.

[56] A. Zoghlami and G. Paës, “Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis,” Dec. 18, 2019, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fchem.2019.00874.

[57] P. D. Patil, S. P. Patil, R. K. Kelkar, N. P. Patil, P. V. Pise, and S. S. Nadar, “Enzyme-assisted supercritical fluid extraction: An integral approach to extract bioactive compounds,” Oct. 01, 2021, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.tifs.2021.07.032.

[58] S. J. Marathe, S. B. Jadhav, S. B. Bankar, and R. S. Singhal, “Enzyme-Assisted Extraction of Bioactives,” in *Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications*, Springer International Publishing, 2017, pp. 171–201. doi: 10.1007/978-3-319-51639-4_8.

[59] M. Mushtaq, B. Sultana, S. Akram, F. Anwar, A. Adnan, and S. S. H. Rizvi, “Enzyme-assisted supercritical fluid extraction: an alternative and green technology for non-extractable polyphenols,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 409, no. 14, pp. 3645–3655, May 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0309-7.

[60] M. Mushtaq, B. Sultana, F. Anwar, A. Adnan, and S. S. H. Rizvi, “Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel,” *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 104, pp. 122–131, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.supflu.2015.05.020.

[61] S. R. Hassan and A. M. Al-Yaqoobi, “Assessment of Ultrasound-Assisted Extraction of Caffeine and its Bioactivity,” *Journal of Ecological Engineering*, vol. 24, no. 3, pp. 126–133, 2023, doi: 10.12911/22998993/157540.

[62] E. S. Dassoff and Y. O. Li, “Mechanisms and effects of ultrasound-assisted supercritical CO 2 extraction,” Apr. 01, 2019, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.tifs.2019.03.001.

[63] J. Azmir *et al.*, “Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review,” *J Food Eng*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.

[64] J. Menzio, A. Binello, A. Barge, and G. Cravotto, “Highly-efficient caffeine recovery from green coffee beans under ultrasound-assisted SC-CO2 extraction,” *Processes*, vol. 8, no. 9, Sep. 2020, doi: 10.3390/pr8091062.

[65] MRS Scientific, “BATH ULTRASONIC BRANSON MODEL M1800H-E – MRS Scientific.” Accessed: Sep. 14, 2025. [Online]. Available: https://www.mrs-scientific.com/equipment/general-purpose-equipment/baths/ultrasonic-baths/bath-ultrasonic-branson-model-m1800h-e/

[66] E. Arango-Agudelo, Y. Rendón-Muñoz, E. Cadena-Chamorro, J. F. Santa, and R. Buitrago-Sierra, “Evaluation of Colombian Coffee Waste to Produce Antioxidant Extracts,” *Bioresources*, vol. 18, no. 3, pp. 5703–5723, 2023, doi: 10.15376/biores.18.3.5703-5723.

[67] P. S. Murthy and M. Madhava Naidu, “Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review,” Sep. 2012. doi: 10.1016/j.resconrec.2012.06.005.

[68] P. Esquivel and V. M. Jiménez, “Functional properties of coffee and coffee by-products,” *Food Research International*, vol. 46, no. 2, pp. 488–495, May 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.028.

[69] L. F. Ballesteros, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, “Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin,” *Food Bioproc Tech*, vol. 7, no. 12, pp. 3493–3503, Dec. 2014, doi: 10.1007/s11947-014-1349-z.

[70] N. Rodríguez-Valencia, *Aplicación de la bioeconomía circular en el proceso de beneficio de café con cero residuos*. Cenicafé, 2023. doi: 10.38141/cenbook-0032.

[71] P. S. Murthy and M. Madhava Naidu, “Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review,” Sep. 2012. doi: 10.1016/j.resconrec.2012.06.005.

[72] M. Dias, M. M. Melo, R. F. Schwan, and C. F. Silva, “A new alternative use for coffee pulp from semi-dry process to β-glucosidase production by Bacillus subtilis,” *Lett Appl Microbiol*, vol. 61, no. 6, pp. 588–595, Dec. 2015, doi: 10.1111/lam.12498.

[73] E. Rojas-Orduña, M. Hernández-Carrión, J. D. Gómez-Franco, C. E. Narváez-Cuenca, and A. del P. Sánchez-Camargo, “Utilization of red and yellow Coffea arabica var. Caturra pulp: macronutrient analysis, carotenoid extraction, and encapsulation for dairy product enrichment,” *Front Nutr*, vol. 10, 2023, doi: 10.3389/fnut.2023.1231049.

[74] S. Cañas *et al.*, “Gastrointestinal Digestion and Absorption of Antioxidant Phenolic Compounds and Caffeine from the Coffee Pulp under Simulated Conditions,” MDPI AG, May 2022, p. 1. doi: 10.3390/iecn2022-12395.

[75] J. A. Venegas-Sánchez and L. Díaz-Gómez, “Deslignificación de olote de maíz por ultrasonido,” *Revista Tecnología en Marcha*, Dec. 2023, doi: 10.18845/tm.v36i10.7009.

[76] T. Widjaja, A. Altway, Z. Lini, and T. Iswanto, “Two-stage pre-treatment of coffee pulp waste to optimize the reducing sugar production using enzymatic hydrolysis,” 2019.

[77] J. A. Serna-Jiménez *et al.*, “Advanced extraction of caffeine and polyphenols from coffee pulp: Comparison of conventional and ultrasound-assisted methods,” *LWT*, vol. 177, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.lwt.2023.114571.

[78] IARC, *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans . Vol. 51 : Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal*. IARC, 1991.

[79] C. Pereira-Leite, M. Bom, A. Ribeiro, C. Almeida, and C. Rosado, “Exploring Stearic-Acid-Based Nanoparticles for Skin Applications—Focusing on Stability and Cosmetic Benefits,” *Cosmetics*, vol. 10, no. 4, Aug. 2023, doi: 10.3390/cosmetics10040099.

[80] X. Wang, Y. Jia, and H. He, “The Role of Linoleic Acid in Skin and Hair Health: A Review,” Jan. 01, 2025, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms26010246.

[81] G. M. Ameca, M. E. O. Cerrilla, P. Z. Córdoba, A. D. Cruz, M. S. Hernández, and J. H. Haro, “Chemical composition and antioxidant capacity of coffee pulp,” *Ciencia e Agrotecnologia*, vol. 42, no. 3, pp. 307–313, May 2018, doi: 10.1590/1413-70542018423000818.

[82] MARIANA DEL PILAR CERQUERA VARGAS, “Evaluación de las diferentes estrategias de aprovechamiento de la pulpa de café en el Huila,” FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA, Bogotá, 2022.

[83] M. M. Urugo *et al.*, “Green valorization of coffee industry residues: Emerging innovations and their role in sustainable food and feed applications,” Dec. 01, 2025, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.afres.2025.101181.

[84] V. Matuk-Velasco, G. Inés Puerta-Quintero, and N. Rodríguez-Valencia, “Impacto biologico de los efluentes del beneficio humedo del café,” 1997.

[85] R. Cervantes Beyra *et al.*, “Efecto de la pulpa de Coffea arabica L. sobre la microflora de tres unidades de suelos,” *Rev. Protección Veg*, vol. 30, no. 2, pp. 115–122, 2015.

[86] Francisco David Ramos Cuesta, “Compostaje pulpa de café, una alternativa de transición de los fertilizantes tradicionales,” *Agricolae Habitat*, 2022, doi: 10.13140/RG.2.2.20638.6176.

[87] D. L. G. Aguilar, J. P. R. Miranda, J. A. E. Muñoz, and P. Jhon Fredy Betancur, “Coffee pulp: A sustainable alternative removal of Cr (VI) in wastewaters,” *Processes*, vol. 7, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/pr7070403.

[88] D. L. Gómez-Aguilar, J. A. Esteban-Muñoz, J. P. Rodríguez-Miranda, D. Baracaldo-Guzmán, and O. J. Salcedo-Parra, “Desorption of Coffee Pulp Used as an Adsorbent Material for Cr(III and VI) Ions in Synthetic Wastewater: A Preliminary Study,” *Molecules*, vol. 27, no. 7, Apr. 2022, doi: 10.3390/molecules27072170.

[89] D. L. G. Aguilar, J. P. R. Miranda, D. B. Guzmán, and J. A. E. Muñoz, “Using coffee pulp as bioadsorbent for the removal of manganese (Mn (II)) from synthetic wastewater,” *Water (Switzerland)*, vol. 12, no. 9, Sep. 2020, doi: 10.3390/w12092500.

[90] M. El Achaby *et al.*, “Bio-sourced porous cellulose microfibrils from coffee pulp for wastewater treatment,” *Cellulose*, vol. 26, no. 6, pp. 3873–3889, Apr. 2019, doi: 10.1007/s10570-019-02344-w.

[91] M. Gonçalves, M. C. Guerreiro, P. H. Ramos, L. C. A. De Oliveira, and K. Sapag, “Activated carbon prepared from coffee pulp: Potential adsorbent of organic contaminants in aqueous solution,” *Water Science and Technology*, vol. 68, no. 5, pp. 1085–1090, 2013, doi: 10.2166/wst.2013.349.

[92] E. Carvajal-Flórez and S. M. Oakley, “Coffee pulp characterization and treatment as adsorbent material for heavy metal removal from landfill leachates,” *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 20, no. 8, pp. 8241–8260, Aug. 2023, doi: 10.1007/s13762-022-04557-2.

[93] R. Cubero-Abarca, R. Moya, J. Valaret, and M. Tomazello Filho, “USE OF COFFEE (Coffea arabica) PULP FOR THE PRODUCTION OF BRIQUETTES AND PELLETS FOR HEAT GENERATION Uso de pulpa de café (Coffea arabica) para a fabricação de briquetes e pellets para geração de calor,” 2014. [Online]. Available: http://pelletics.com/

[94] E. G. T. Menezes, J. R. Do Carmo, A. G. T. Menezes, J. G. L. F. Alves, C. J. Pimenta, and F. Queiroz, “Use of different extracts of coffee pulp for the production of bioethanol,” *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 169, no. 2, pp. 673–687, Jan. 2013, doi: 10.1007/s12010-012-0030-0.

[95] T. Widjaja, A. Altway, S. Nurkhamidah, L. Edahwati, F. Zata Lini, and F. Oktafia, “THE EFFECT OF PRETREATMENT AND VARIETY OF MICROORGANISMS TO THE PRODUCTION OF ETHANOL FROM COFFEE PULP,” vol. 11, no. 2, 2016, [Online]. Available: www.arpnjournals.com

[96] R. Gurram, M. Al-Shannag, S. Knapp, T. Das, E. Singsaas, and M. Alkasrawi, “Technical possibilities of bioethanol production from coffee pulp: A renewable feedstock,” *Clean Technol Environ Policy*, vol. 18, no. 1, pp. 269–278, Jan. 2016, doi: 10.1007/s10098-015-1015-9.

[97] D. Shenoy *et al.*, “A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste,” *Biomass Bioenergy*, vol. 35, no. 10, pp. 4107–4111, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.biombioe.2011.05.016.

[98] J. Sadhukhan, E. Martinez-Hernandez, M. A. Amezcua-Allieri, J. Aburto, and J. A. Honorato S, “Economic and environmental impact evaluation of various biomass feedstock for bioethanol production and correlations to lignocellulosic composition,” *Bioresour Technol Rep*, vol. 7, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.biteb.2019.100230.

[99] D. Orrego, A. D. Zapata-Zapata, and D. Kim, “Optimization and scale-up of coffee mucilage fermentation for ethanol production,” *Energies (Basel)*, vol. 11, no. 4, Apr. 2018, doi: 10.3390/en11040786.

[100] B. Chala, H. Oechsner, S. Latif, and J. Müller, “Biogas potential of coffee processing waste in Ethiopia,” *Sustainability (Switzerland)*, vol. 10, no. 8, Jul. 2018, doi: 10.3390/su10082678.

[101] T. Selvankumar *et al.*, “Process optimization of biogas energy production from cow dung with alkali pre-treated coffee pulp,” *3 Biotech*, vol. 7, no. 4, Aug. 2017, doi: 10.1007/s13205-017-0884-5.

[102] G. Corro, U. Pal, F. Bañuelos, and M. Rosas, “Generation of biogas from coffee-pulp and cow-dung co-digestion: Infrared studies of postcombustion emissions,” *Energy Convers Manag*, vol. 74, pp. 471–481, 2013, doi: 10.1016/j.enconman.2013.07.017.

[103] G. Corro, U. Pal, and S. Cebada, “Enhanced biogas production from coffee pulp through deligninocellulosic photocatalytic pretreatment,” *Energy Sci Eng*, vol. 2, no. 4, pp. 177–187, Oct. 2014, doi: 10.1002/ese3.44.

[104] R. Miñón-Fuentes and O. Aguilar-Juárez, “Hydrogen production from coffee pulp by dark fermentation,” *Water Science and Technology*, vol. 80, no. 9, pp. 1692–1701, Nov. 2019, doi: 10.2166/wst.2019.416.

[105] A. C. Villa Montoya, R. Cristina da Silva Mazareli, E. L. Silva, and M. B. A. Varesche, “Improving the hydrogen production from coffee waste through hydrothermal pretreatment, co-digestion and microbial consortium bioaugmentation,” *Biomass Bioenergy*, vol. 137, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105551.

[106] A. K. Vuppaladadiyam *et al.*, “A critical review on biomass pyrolysis: Reaction mechanisms, process modeling and potential challenges,” Jun. 01, 2023, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.joei.2023.101236.

[107] M. M. Parascanu, M. Puig-Gamero, G. Soreanu, J. L. Valverde, and L. Sanchez-Silva, “Comparison of three Mexican biomasses valorization through combustion and gasification: Environmental and economic analysis,” *Energy*, vol. 189, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.energy.2019.116095.

[108] C. L. Mendoza Martinez, J. Saari, Y. Melo, M. Cardoso, G. M. de Almeida, and E. Vakkilainen, “Evaluation of thermochemical routes for the valorization of solid coffee residues to produce biofuels: A Brazilian case,” Mar. 01, 2021, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.rser.2020.110585.

[109] A. S. G. Costa *et al.*, “Coffee Pulp from Azores: A Novel Phytochemical-Rich Food with Potential Anti-Diabetic Properties,” *Foods*, vol. 14, no. 2, Jan. 2025, doi: 10.3390/foods14020306.

[110] G. Munguía-Ameca, M. E. Ortega-Cerrilla, J. G. Herrera-Haro, R. Bárcena-Gama, C. Nava-Cuéllar, and P. Zetina-Córdoba, “Growth Performance, Rumen Fermentation, In Vivo Digestibility, and Meat Quality of Pelibuey Lambs Fed a Diet with Ensiled Coffee Pulp,” *Animals*, vol. 13, no. 22, Nov. 2023, doi: 10.3390/ani13223462.

[111] W. Tapingkae *et al.*, “The Use of Coffee Cherry Pulp Extract as an Alternative to an Antibiotic Growth Promoter in Broiler Diets,” *Animals*, vol. 15, no. 2, Jan. 2025, doi: 10.3390/ani15020244.

[112] K. Huanhong *et al.*, “Dietary supplementation of coffee pulp extract enhances growth performance and intestinal morphology in broiler chicken,” *Poult Sci*, vol. 104, no. 3, Mar. 2025, doi: 10.1016/j.psj.2025.104873.

[113] S. Antúnez *et al.*, “Effect of Different Levels of Extruded Coffee (Coffea arabica) Pulp Flour on the Productive Performance and Intestinal Morphometry of Cobb 500 Broiler Chickens,” *Animals*, vol. 14, no. 8, Apr. 2024, doi: 10.3390/ani14081170.

[114] A. Gil-Ramírez *et al.*, “Unveiling the Nutritional Profile and Safety of Coffee Pulp as a First Step in Its Valorization Strategy,” *Foods*, vol. 13, no. 18, Sep. 2024, doi: 10.3390/foods13183006.

[115] A. Picon, Y. Campanero, C. Sánchez, I. Álvarez, and E. Rodríguez-Mínguez, “Valorization of Coffee Cherry By-Products Through Fermentation by Human Intestinal Lactobacilli in Functional Fermented Milk Beverages,” *Foods*, vol. 14, no. 1, Jan. 2025, doi: 10.3390/foods14010044.

[116] K. M. I. Bashir *et al.*, “Validating the Health Benefits of Coffee Berry Pulp Extracts in Mice with High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes,” *Antioxidants*, vol. 13, no. 1, Jan. 2024, doi: 10.3390/antiox13010010.

[117] D. Turck *et al.*, “Safety of dried coffee husk (cascara) from Coffea arabica L. as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283,” *EFSA Journal*, vol. 20, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.2903/j.efsa.2022.7085.

[118] A. Pérez Calvo, N. Paz Ruiz, and Z. Delgado Espinoza, “Coffee Pulp: A Sustainable and Affordable Source for Developing Functional Foods,” *Processes*, vol. 11, no. 6, Jun. 2023, doi: 10.3390/pr11061693.

[119] S. Patil, V. Pimpley, K. Warudkar, and P. S. Murthy, “Valorisation of Coffee Pulp for Development of Innovative Probiotic Beverage Using Kefir: Physicochemical, Antioxidant, Sensory Analysis and Shelf Life Studies,” *Waste Biomass Valorization*, vol. 13, no. 2, pp. 905–916, Feb. 2022, doi: 10.1007/s12649-021-01554-3.

[120] J. DePaula *et al.*, “Volatile Fingerprinting and Sensory Profiles of Coffee Cascara Teas Produced in Latin American Countries,” *Foods*, vol. 11, no. 19, Oct. 2022, doi: 10.3390/foods11193144.

[121] S. Rosales Delgado, A. F. Alzate Arbeláez, K. Zapata Acosta, F. B. Cortés, and B. A. Rojano, “Improvement of probiotic viability through the design of novel biomaterials using coffee pulp wastes and Lactobacillus rhamnosus,” *Food Science and Technology International*, vol. 29, no. 6, pp. 573–585, Sep. 2023, doi: 10.1177/10820132221100683.

[122] L. H. Reichembach, P. Guerrero, C. L. de Oliveira Petkowicz, and K. de la Caba, “Valorization of pectins from coffee wastes for the development of pectin-chitosan films,” *Carbohydr Polym*, vol. 334, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.carbpol.2024.122057.

[123] S. Malarat *et al.*, “Preparation of Nanocellulose from Coffee Pulp and Its Potential as a Polymer Reinforcement,” *ACS Omega*, vol. 8, no. 28, pp. 25122–25133, Jul. 2023, doi: 10.1021/acsomega.3c02016.

[124] S. R. Sommano *et al.*, “Utilization of coffee pulp for the production of sustainable cellulosic composite and plant-based hydrogel as a potential human wound dressing,” *Food Structure*, vol. 37, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.foostr.2023.100347.

[125] A. Vallejos-Jiménez *et al.*, “Development of Novel Pectin-Based Films from Coffee Waste: Mucilage and Pulp,” *Waste Biomass Valorization*, 2025, doi: 10.1007/s12649-025-02926-9.

[126] E. Král, J. L. Rukov, and A. C. Mendes, “Coffee Cherry on the Top: Disserting Valorization of Coffee Pulp and Husk,” Mar. 01, 2024, *Springer*. doi: 10.1007/s12393-023-09352-4.

[127] J. A. Serna-Jiménez, J. A. Siles, M. de los Ángeles Martín, and A. F. Chica, “A Review on the Applications of Coffee Waste Derived from Primary Processing: Strategies for Revalorization,” Nov. 01, 2022, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/pr10112436.

[128] M. Rebollo-Hernanz *et al.*, “Biorefinery and Stepwise Strategies for Valorizing Coffee By-Products as Bioactive Food Ingredients and Nutraceuticals,” Jul. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/app13148326.

[129] S. R. Hughes *et al.*, “Sustainable conversion of coffee and other crop wastes to biofuels and bioproducts using coupled biochemical and thermochemical processes in a multi-stage biorefinery concept,” Oct. 01, 2014, *Springer Verlag*. doi: 10.1007/s00253-014-5991-1.

A. Anexo 1: Datos experimentales completos

Se presentan los valores crudos y procesados de cada réplica experimental, incluyendo la liberación de azúcares y cafeína, así como los promedios y desviaciones estándar empleados en el análisis estadístico.

Tabla A1 - 1: Caracterización lignocelulósica

Parámetro (%)	Promedio Muestra inicial	Desviación	Muestra post extracción	Desviación
Liposolubles	6,17	1,69	12,43	0,67
Hidrosolubles	47,55	2,25	46,05	1,12
Lignina soluble	0,18	0,03	0,04	0,00
Lignina insoluble	24,87	1,39	26,52	0,14
Celulosa	19,53	1,68	24,21	2,65
Hemicelulosa	23,47	1,87	29,26	3,63
Cenizas	11,55	0,10	3,85	0,13

Tabla A1 - 2: Medida de azúcares totales a diferentes dosis enzimáticas

	Cellic		Viscozyme	
Relación E/S	Promedio concentración	Desviación	Promedio concentración	Desviación
10,667	6,882	0,947	8,089	0,939
12,800	8,923	0,823	8,212	0,230
16,000	10,782	1,328	10,763	0,723
21,333	9,978	2,946	11,322	1,413
32,000	9,817	0,821	10,977	1,234

Tabla A1 - 3: Azúcares totales en pulpa de café

Control pulpa		
Control	Peso pulpa [g]	Azúcares pulpa [g/L]
Control P1	0,5	4,584
Control P2	0,75	5,719
Control P3	1	6,855
Control P4	1,25	7,990
Control P5	1,5	9,126

Tabla A1 - 4: Cuantificación cafeína en pulpa de café

Cafeína	
Promedio [mg/g pulpa]	Desviación
9,493	0,703

Tabla A1 - 5: Cuantificación cafeína en solución: Enzimas vs Enzimas + Ultrasonido

Trat	Caf ext. por gramo de pulpa [mg caf/ g pulpa seca]

	E	E + S
C0,75	4,150	3,510
C1	2,571	3,611
C1,25	4,055	2,457
V0,75	2,951	2,962
V1	3,538	3,701
V1,25	3,220	3,464

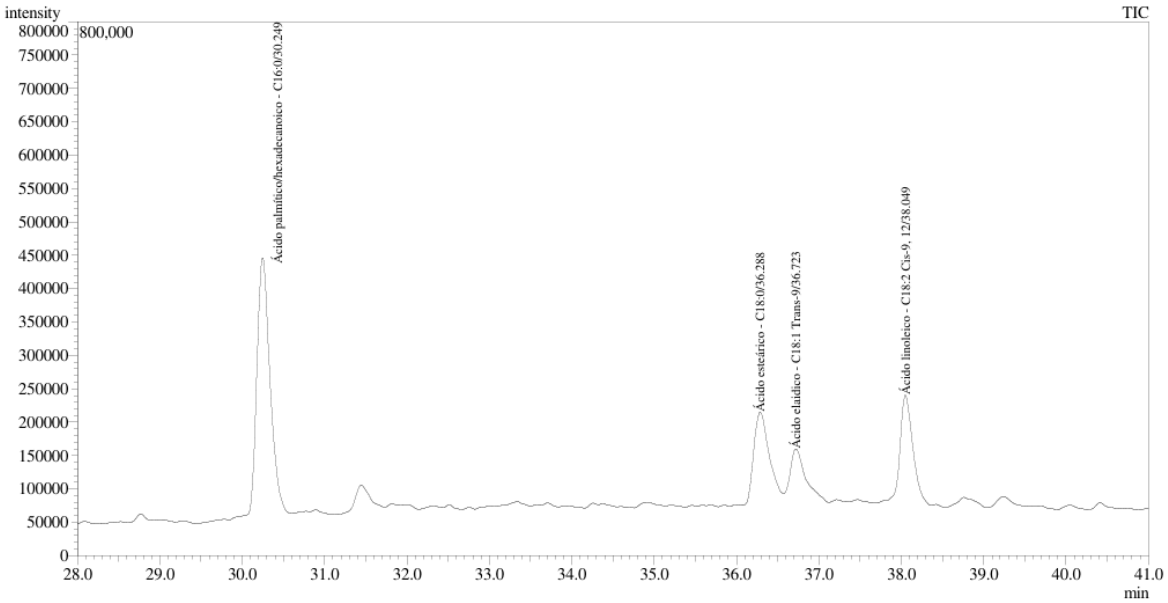
Tabla A1 - 6: Curva extracción con CO2 supercrítico preeliminar

Tiempo [Min]	Extracto [g]	Rendimiento	Cafeína extraída [mg]
15	0,141	2,82%	0,013
30	0,005	0,10%	0,750
45	0,002	0,04%	0,482
60	0,002	0,03%	0,426
75	0,001	0,03%	0,364
90	0,001	0,02%	0,347
105	0,001	0,02%	0,226
120	0,001	0,01%	0,256
135	0,001	0,01%	0,287

Tabla A1 - 7: Cuantificación Teobromina en pulpa de café

Muestra	Concentración [mg/L]	Teobromina [mg]	Peso pulpa [gr]	Teobromina [mg/gr pulpa]
PO1	38,977	0,117	1,861	0,063
PO2	39,876	0,120	1,898	0,063
PO3	43,688	0,131	1,879	0,070

Figura A1 - 1: Cuantificación ácidos grasos



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	30.249	30.060	30.575	4304116	47.67	386924	50.23	Ácido palmítico/hexadecanoico - C16:0
2	36.288	36.105	36.575	1890846	20.94	139895	18.16	Ácido esteárico - C18:0
3	36.723	36.575	37.120	1123126	12.44	82456	10.70	Ácido elaidico - C18:1 Trans-9
4	38.049	37.830	38.365	1710258	18.94	161001	20.90	Ácido linoleico - C18:2 Cis-9, 12
				9028346	100.00	770276	100.00	

B. Anexo: Resultados estadísticos

Recoge las tablas completas de análisis de varianza (ANOVA) y los gráficos de superficie de respuesta obtenidos a partir de los diseños experimentales, así como los diagnósticos de ajuste de los modelos.

PRUEBA P AZÚCARES
ANOVA de un solo factor: Viscozyme; Cellic

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	α = 0,05
Filas no utilizadas	28

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	4,662	4,662	0,83	0,398
Error	6	33,736	5,623		
Total	7	38,397			

Medias

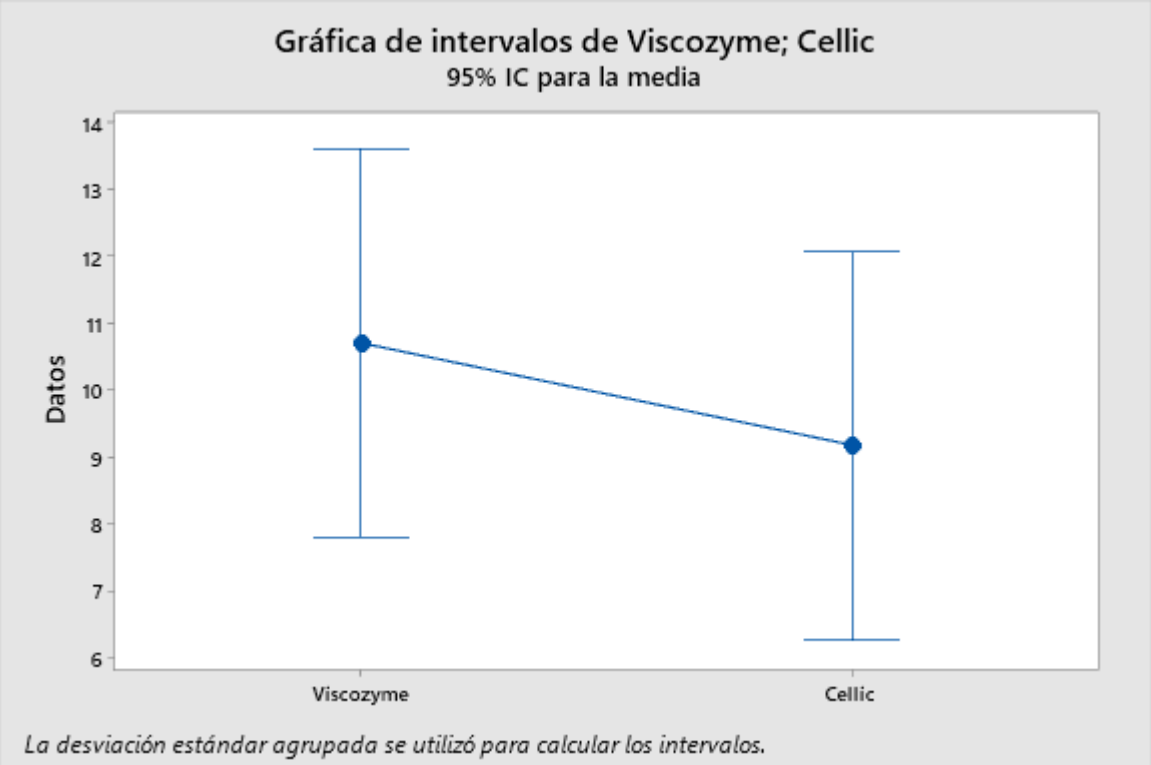
Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Viscozyme	4	10,701	1,696	(7,800; 13,602)
Cellic	4	9,17	2,89	(6,27; 12,08)

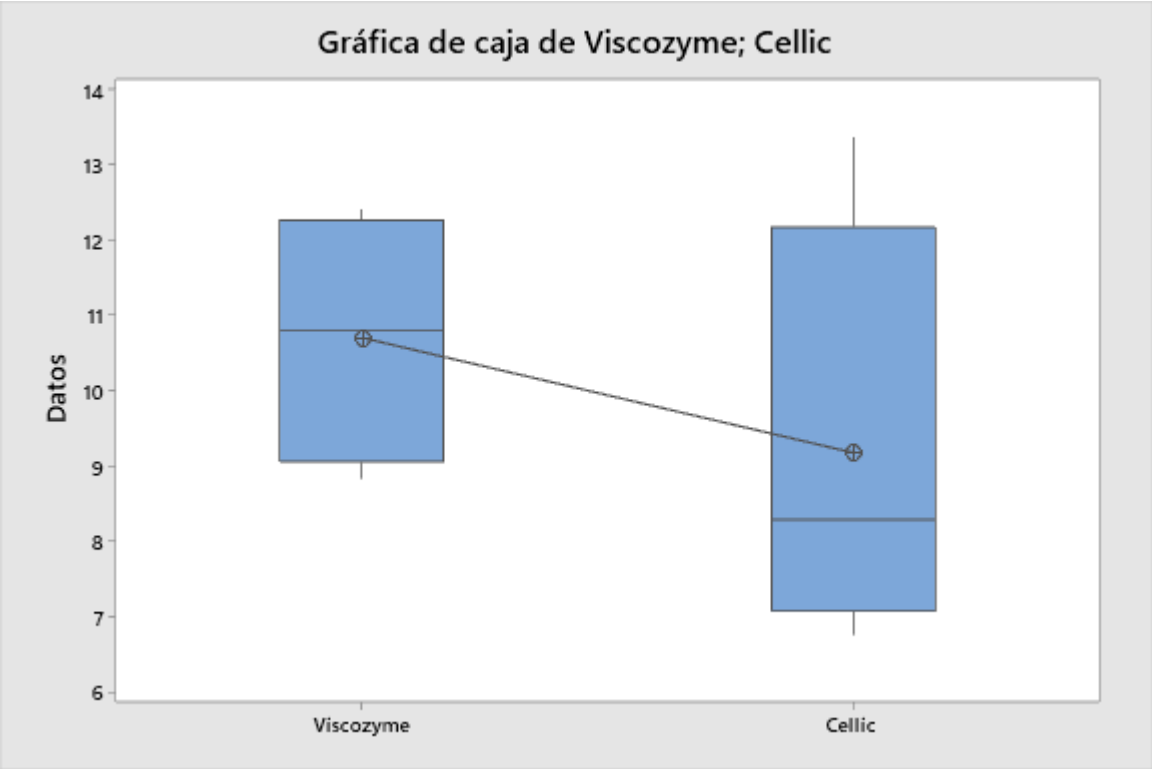
Desv.Est. agrupada = 2,37120

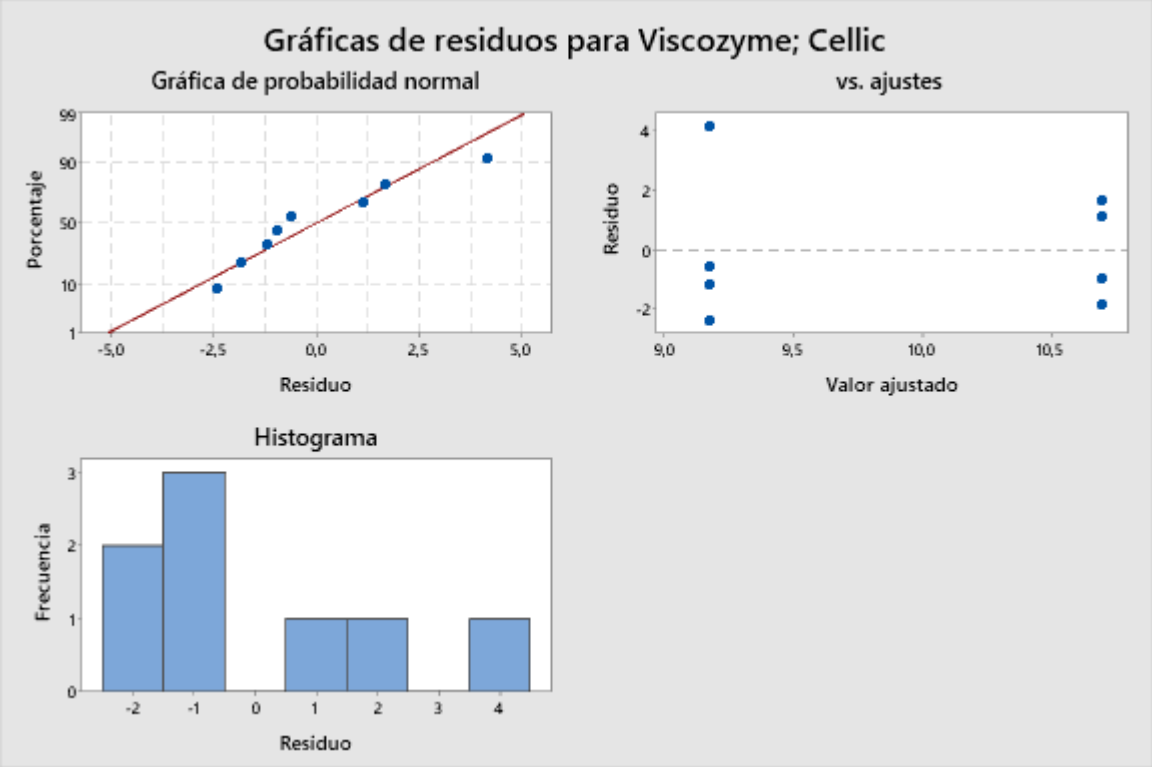
Comparaciones en parejas de Tukey

Factor	N	Media	Agrupación
Viscozyme	4	10,701	A
Cellic	4	9,17	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.




Gráfica de caja de Viscozyme; Cellic
Datos
14
13
12
11
10
9
8
7
6
Viscozyme
Cellic


Gráficas de residuos para Viscozyme; Cellic
Gráfica de probabilidad normal
Porcentaje
99
90
50
10
1
-5,0
-2,5
0,0
2,5
5,0
Residuo
vs. ajustes
Residuo
4
2
0
-2
9,0
9,5
10,0
10,5
Valor ajustado
Histograma
Frecuencia
3
2
1
0
-2
-1
0
1
2
3
4
Residuo

PRUEBA P CAFEÍNA

ANOVA de un solo factor: Viscozyme; Cellic

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	α = 0,05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	0,14597	0,14597	9,63	0,036
Error	4	0,06063	0,01516		
Total	5	0,20660			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Viscozyme	3	3,2080	0,0471	(3,0107; 3,4054)
Cellic	3	3,5200	0,1676	(3,3226; 3,7173)

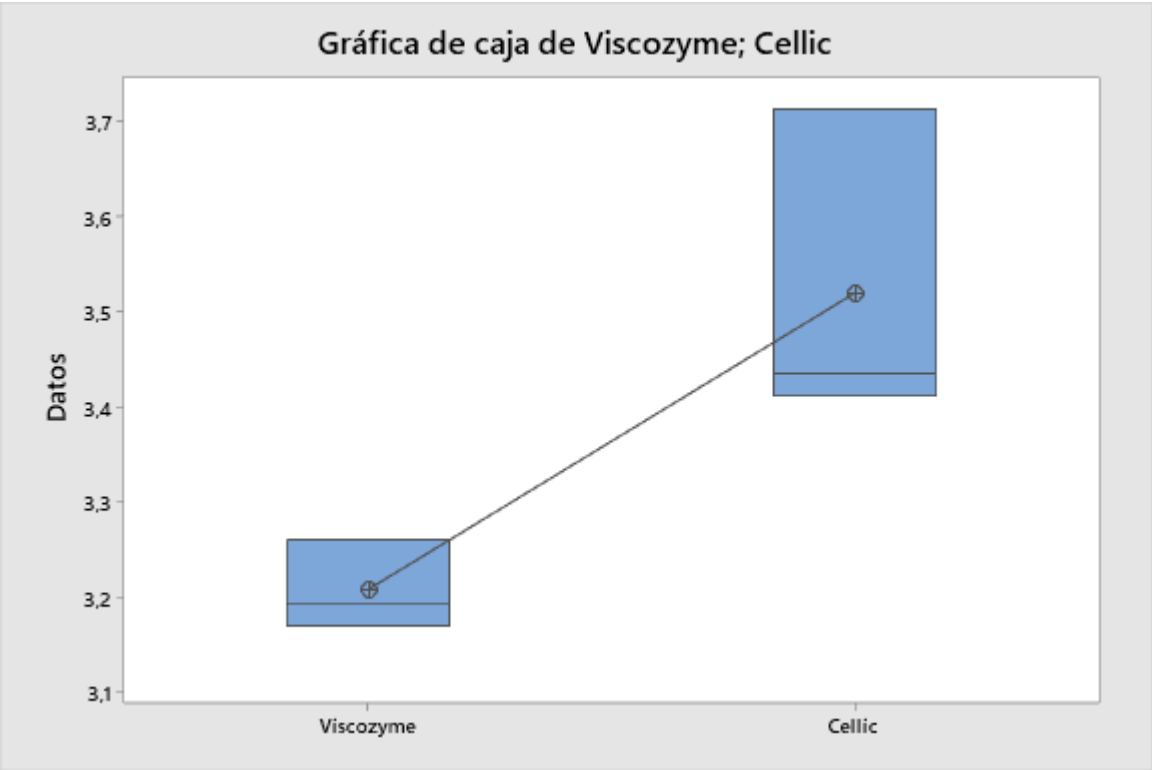
Desv.Est. agrupada = 0,123119

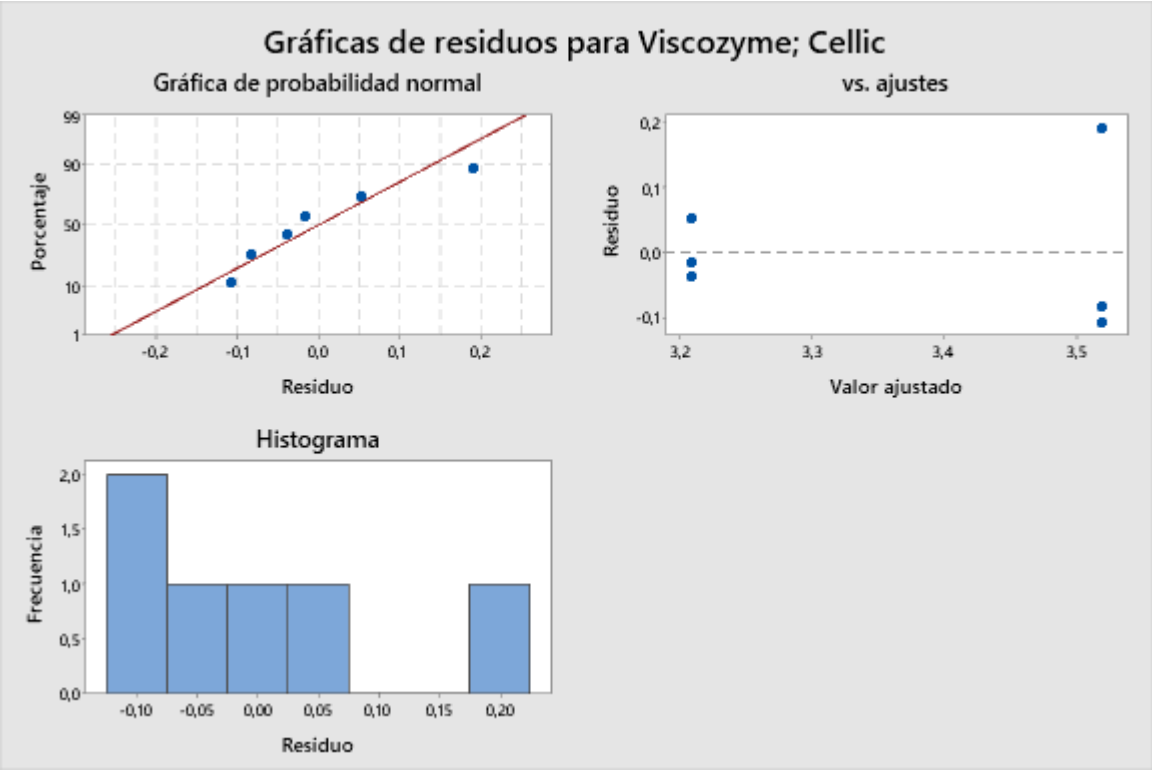
Comparaciones en parejas de Tukey

Factor	N	Media	Agrupación	
Cellic	3	3,5200	A	
Viscozyme	3	3,2080		B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Gráfica de intervalos de Viscozyme; Cellic
95% IC para la media
Datos
3,8
3,7
3,6
3,5
3,4
3,3
3,2
3,1
3,0
Viscozyme
Cellic
La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.


Gráfica de caja de Viscozyme; Cellic
Datos
3,7
3,6
3,5
3,4
3,3
3,2
3,1
Viscozyme
Cellic



Regresión de superficie de respuesta: Rendimiento [%] vs. Temperatura [°C]; Dosis enzima [U/g]

Método

Filas no utilizadas	1

Coeficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	4,080	0,215	18,98	0,000	
Temperatura [°C]	0,901	0,166	5,44	0,000	1,00
Dosis enzima [U/g]	-0,409	0,206	-1,98	0,069	1,01
Temperatura [°C]*Temperatura [°C]	-0,135	0,166	-0,81	0,431	1,04
Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]	-1,298	0,287	-4,52	0,001	1,05
Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]	-0,782	0,216	-3,61	0,003	1,00

Resumen del modelo

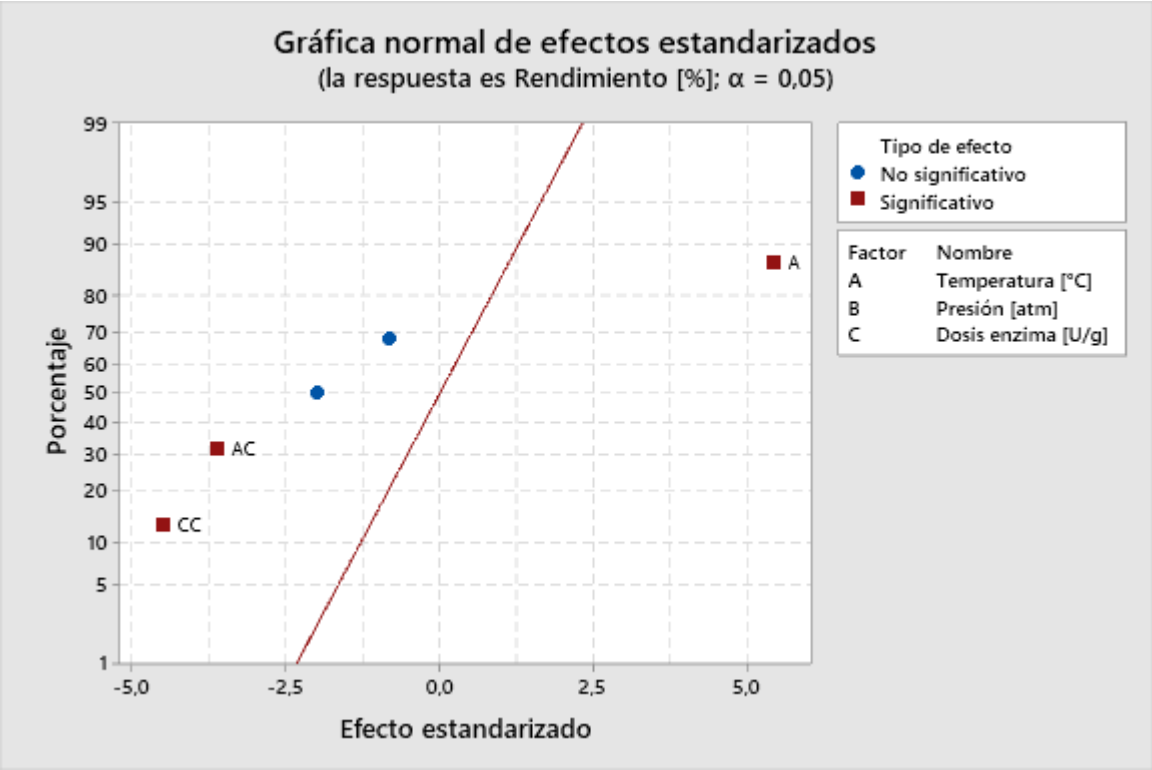
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,611678	84,12%	78,01%	59,76%

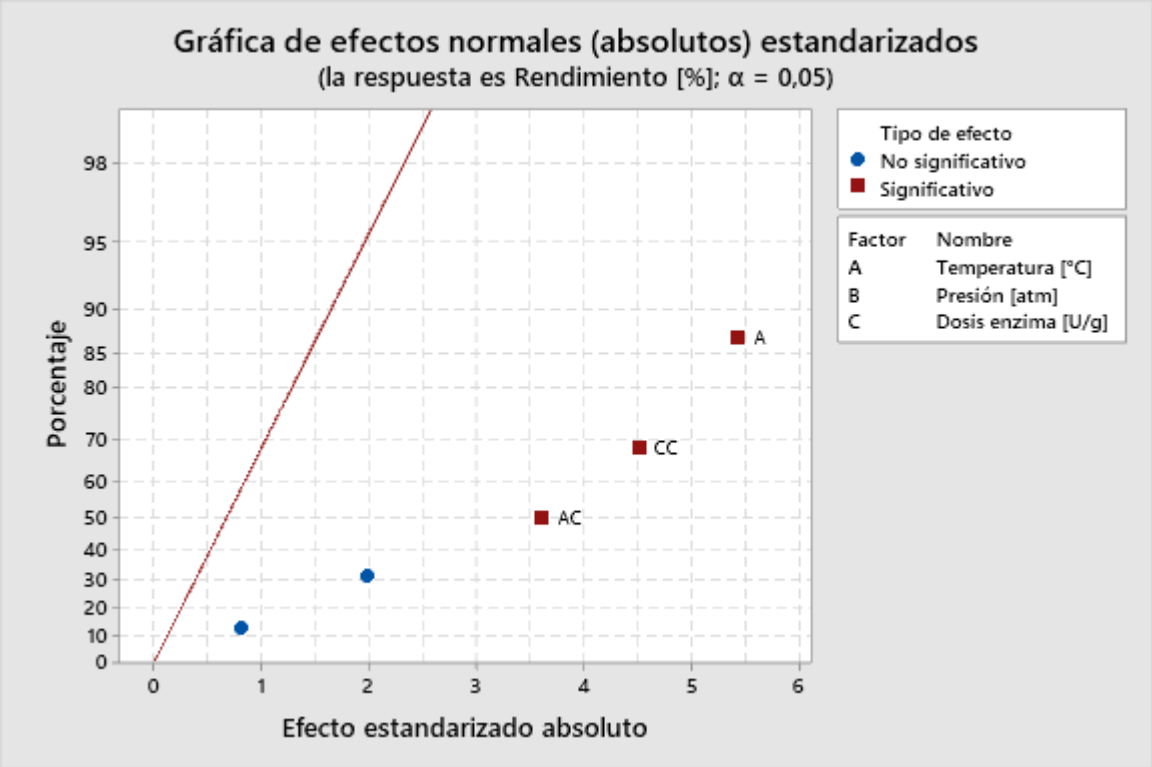
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	25,7619	5,1524	13,77	0,000
Lineal	2	12,5544	6,2772	16,78	0,000
Temperatura [°C]	1	11,0804	11,0804	29,61	0,000
Dosis enzima [U/g]	1	1,4741	1,4741	3,94	0,069
Cuadrado	2	8,7409	4,3705	11,68	0,001
Temperatura [°C]*Temperatura [°C]	1	0,2467	0,2467	0,66	0,431
Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]	1	7,6390	7,6390	20,42	0,001
Interacción de 2 factores	1	4,8880	4,8880	13,06	0,003
Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]	1	4,8880	4,8880	13,06	0,003
Error	13	4,8639	0,3741		
Falta de ajuste	8	2,4343	0,3043	0,63	0,735
Error puro	5	2,4296	0,4859		
Total	18	30,6259			

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

Rendimiento [%] = -12,12 + 0,370 Temperatura [°C]
+ 0,653 Dosis enzima [U/g]
- 0,00166 Temperatura [°C]*Temperatura [°C]
- 0,01142 Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]
- 0,00814 Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]


Gráfica normal de efectos estandarizados
(la respuesta es Rendimiento [%]; α = 0,05)
Porcentaje
99
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
1
-5,0
-2,5
0,0
2,5
5,0
Efecto estandarizado
A
AC
CC
Tipo de efecto
No significativo
Significativo
Factor Nombre
A Temperatura [°C]
B Presión [atm]
C Dosis enzima [U/g]


Gráfica de efectos normales (absolutos) estandarizados
(la respuesta es Rendimiento [%]; α = 0,05)
Porcentaje
98
95
90
85
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
Efecto estandarizado absoluto
A
CC
AC
Tipo de efecto
No significativo
Significativo
Factor Nombre
A Temperatura [°C]
B Presión [atm]
C Dosis enzima [U/g]

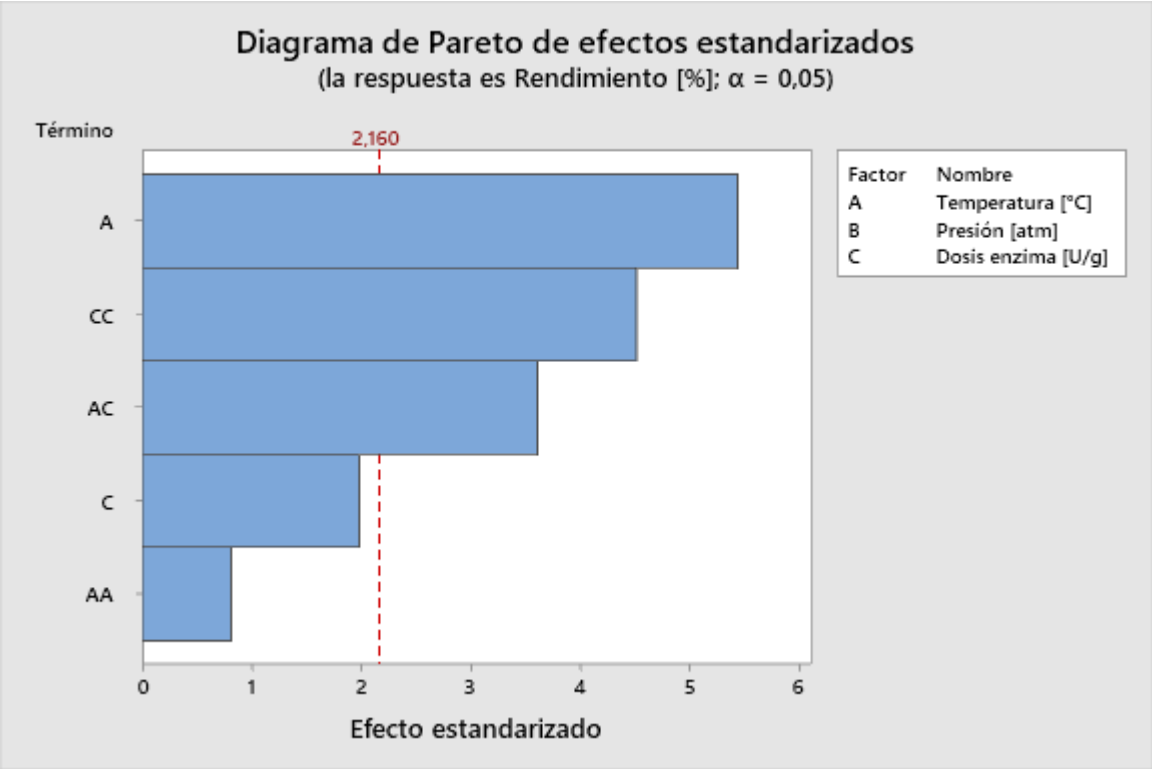
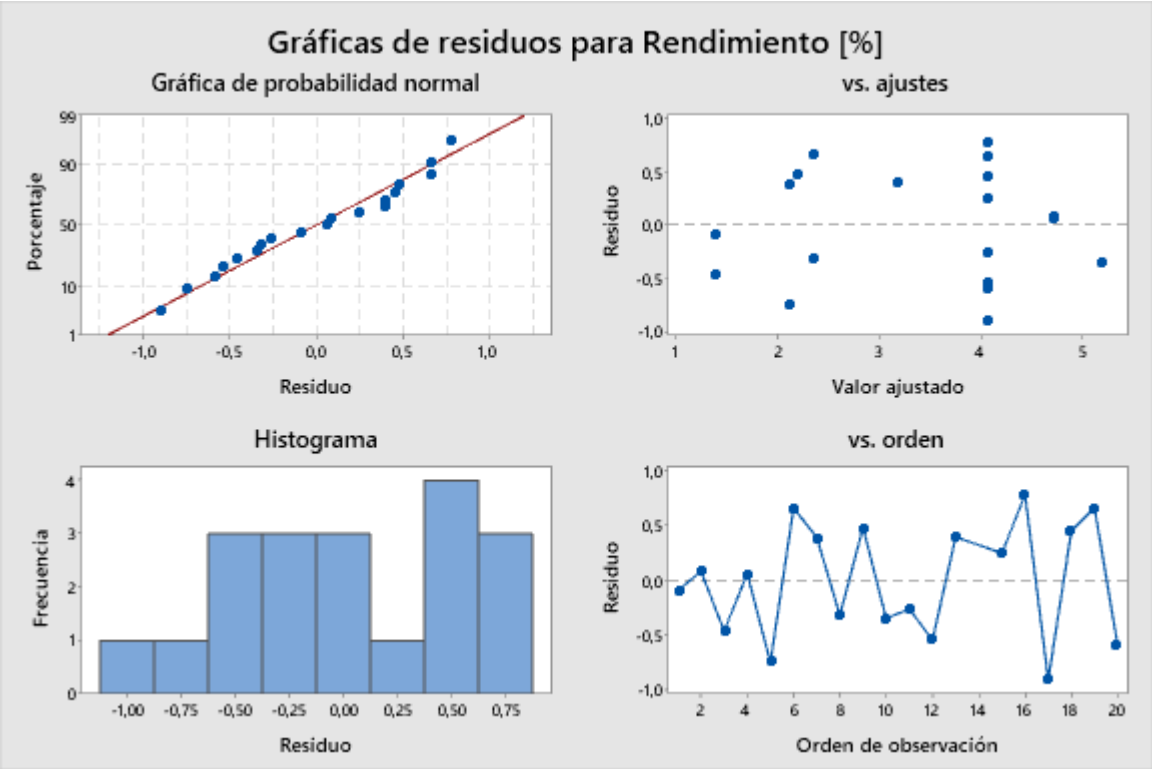


Diagrama de Pareto de efectos estandarizados
(la respuesta es Rendimiento [%]; α = 0,05)
Término
2,160
A
CC
AC
C
AA
0
1
2
3
4
5
6
Efecto estandarizado
Factor Nombre
A Temperatura [°C]
B Presión [atm]
C Dosis enzima [U/g]


Gráficas de residuos para Rendimiento [%]
Gráfica de probabilidad normal
Porcentaje
99
90
50
10
1
-1,0
-0,5
0,0
0,5
1,0
Residuo
vs. ajustes
Residuo
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
1
2
3
4
5
Valor ajustado
Histograma
Frecuencia
4
3
2
1
0
-1,00
-0,75
-0,50
-0,25
0,00
0,25
0,50
0,75
Residuo
vs. orden
Residuo
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Orden de observación

Regresión de superficie de respuesta: Cafeína en pulpa [mg/g] vs. Temperatura [°C]; Presión [atm]; Dosis enzima [U/g]

Método

Filas no utilizadas	2

Coeficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	3,583	0,287	12,49	0,000	
Temperatura [°C]	0,353	0,216	1,64	0,136	1,09
Presión [atm]	-0,882	0,269	-3,28	0,010	1,14
Dosis enzima [U/g]	1,169	0,247	4,73	0,001	1,23
Temperatura [°C]*Temperatura [°C]	0,404	0,201	2,02	0,075	1,05
Presión [atm]*Presión [atm]	-0,649	0,352	-1,84	0,098	1,20
Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]	-0,665	0,267	-2,49	0,034	1,25
Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]	0,745	0,296	2,51	0,033	1,13
Presión [atm]*Dosis enzima [U/g]	-0,757	0,296	-2,55	0,031	1,13

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,734791	84,44%	70,61%	38,99%

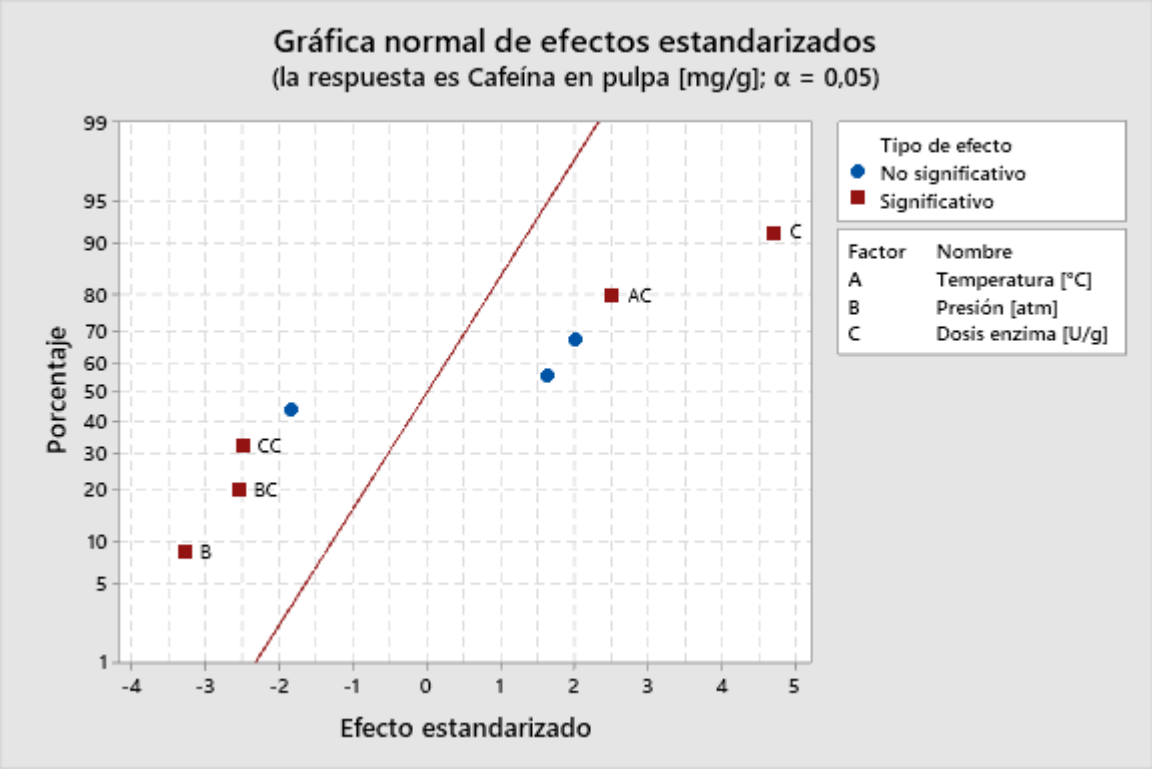
Análisis de Varianza

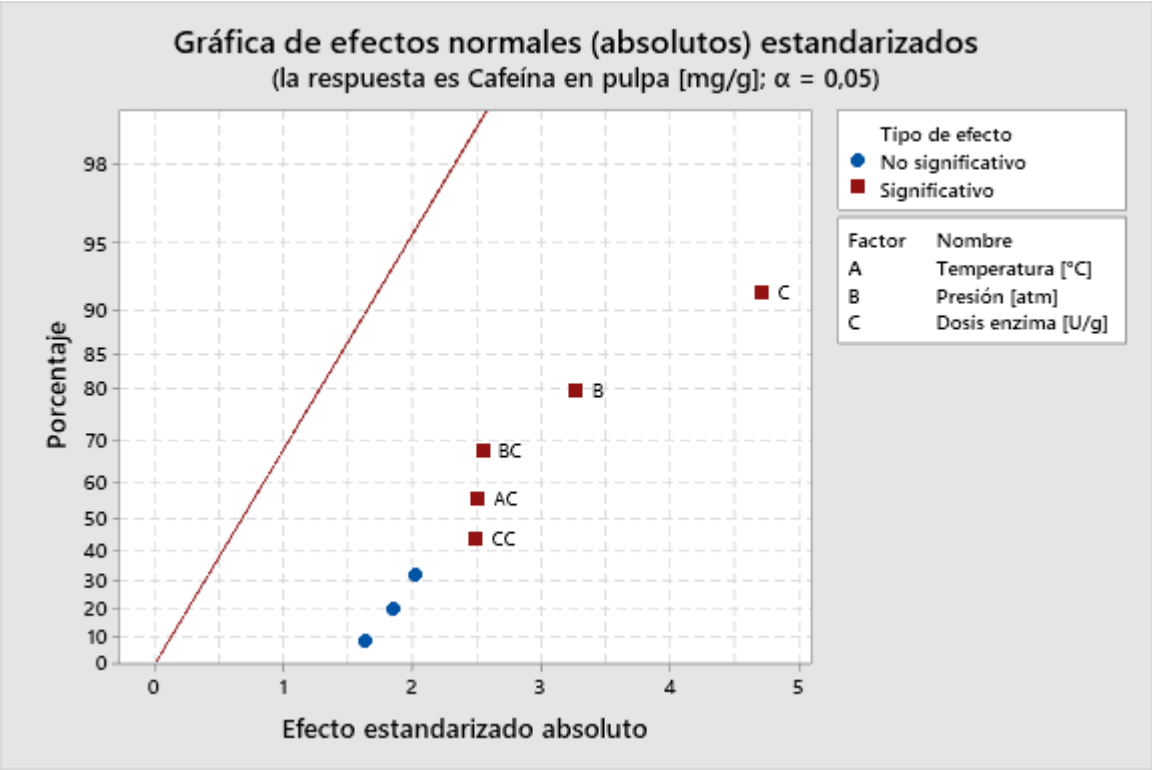
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	26,371	3,2963	6,11	0,007
Lineal	3	16,391	5,4637	10,12	0,003
Temperatura [°C]	1	1,448	1,4477	2,68	0,136
Presión [atm]	1	5,793	5,7933	10,73	0,010
Dosis enzima [U/g]	1	12,061	12,0608	22,34	0,001
Cuadrado	3	9,800	3,2666	6,05	0,015
Temperatura [°C]*Temperatura [°C]	1	2,195	2,1946	4,06	0,075

Presión [atm]*Presión [atm]	1	1,834	1,8336	3,40	0,098
Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]	1	3,358	3,3580	6,22	0,034
Interacción de 2 factores	2	5,619	2,8093	5,20	0,032
Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]	1	3,405	3,4054	6,31	0,033
Presión [atm]*Dosis enzima [U/g]	1	3,517	3,5172	6,51	0,031
Error	9	4,859	0,5399		
Falta de ajuste	4	1,281	0,3202	0,45	0,772
Error puro	5	3,578	0,7157		
Total	17	31,230			

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

Cafeína en pulpa [mg/g] = 3,6 - 0,593 Temperatura [°C]
+ 0,1415 Presión [atm]
+ 0,162 Dosis enzima [U/g]
+ 0,00499 Temperatura [°C]*Temperatura [°C]
- 0,000321 Presión [atm]*Presión [atm]
- 0,00585 Dosis enzima [U/g]*Dosis enzima [U/g]
+ 0,00776 Temperatura [°C]*Dosis enzima [U/g]
- 0,001577 Presión [atm]*Dosis enzima [U/g]




Gráfica de efectos normales (absolutos) estandarizados
(la respuesta es Cafeína en pulpa [mg/g]; α = 0,05)
Porcentaje
98
95
90
85
80
70
60
50
40
30
20
10
0
C
B
BC
AC
CC
0
1
2
3
4
5
Efecto estandarizado absoluto
Tipo de efecto
No significativo
Significativo
Factor Nombre
A Temperatura [°C]
B Presión [atm]
C Dosis enzima [U/g]

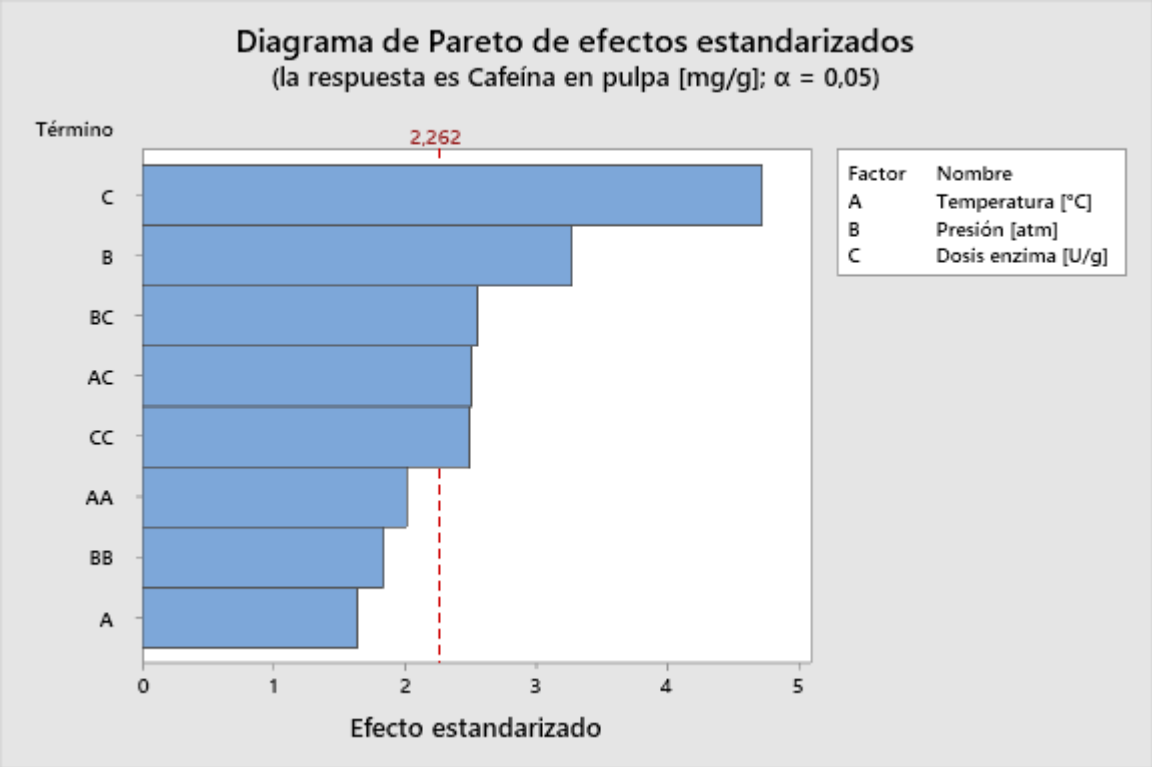
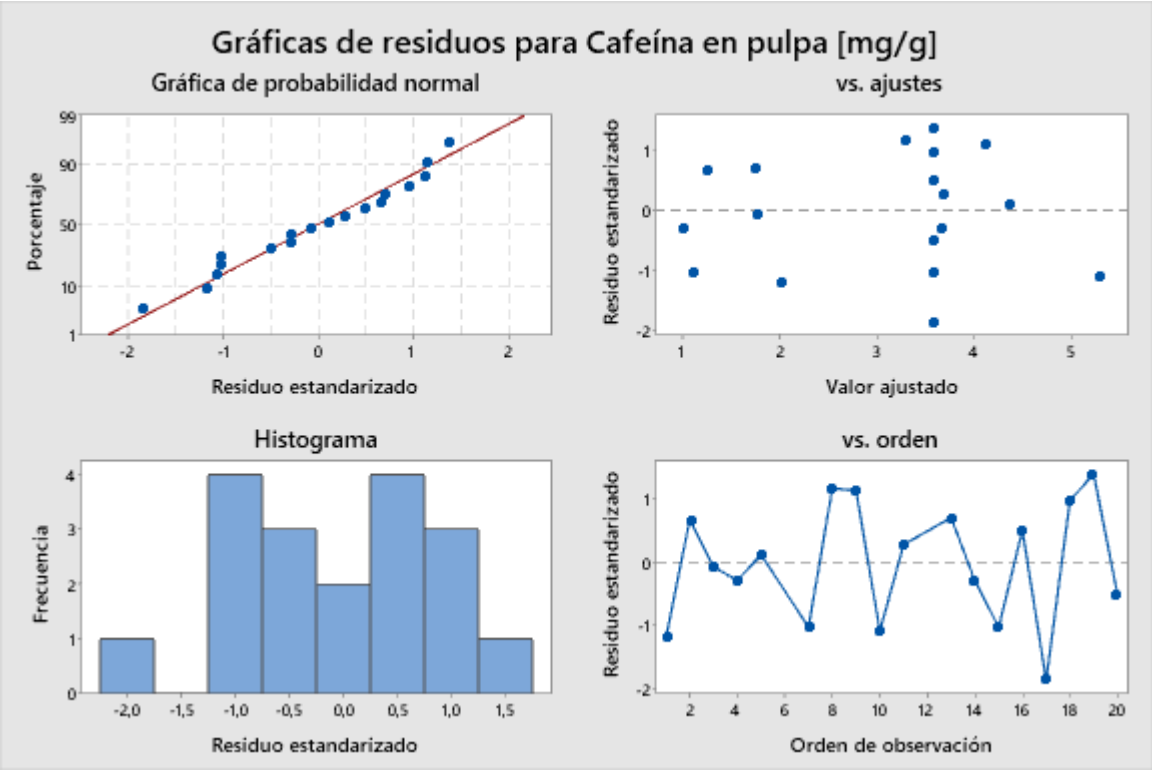


Diagrama de Pareto de efectos estandarizados
(la respuesta es Cafeína en pulpa [mg/g]; α = 0,05)
Término
2,262
C
B
BC
AC
CC
AA
BB
A
0
1
2
3
4
5
Efecto estandarizado
Factor Nombre
A Temperatura [°C]
B Presión [atm]
C Dosis enzima [U/g]


Gráficas de residuos para Cafeína en pulpa [mg/g]
Gráfica de probabilidad normal
Porcentaje
Residuo estandarizado
vs. ajustes
Residuo estandarizado
Valor ajustado
Histograma
Frecuencia
Residuo estandarizado
vs. orden
Residuo estandarizado
Orden de observación