



Escuela de Agronegocios

Proyecto Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en
Ingeniería en Agronegocios

**“Extracción de pectinas a partir del mucílago presente en las aguas
mieles generadas durante el desmucilaginado mecánico del café en
CoopeTarrazú R.L”**

Presentado por:

Jose María Alvarado Vargas

I Semestre, 2023

Hoja de Aprobación del Trabajo Final de Graduación

“Extracción de pectinas a partir del mucílago presente en las aguas mieles generadas durante el desmucilaginado mecánico del café en CoopeTarrazú R.L”

Proyecto Final de Graduación defendido públicamente por Jose María Alvarado Vargas ante el Tribunal Evaluador de la Escuela de Agronegocios del Tecnológico de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el título de Ingeniera en Agronegocios con el grado de Licenciatura.

Ing. Randall Chaves Abarca, MedT.

Profesor Asesor

Ing. Laura Brenes Peralta, PhD.

Profesora Consultora

Ing. Jimmy Porras Barrantes, Máster.

Lector

Dedicatoria

A mi mamá, tía mili y Lalo por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

No me canso de agradecer a Dios por las oportunidades que me ha dado en estos años de estudio y el poder completar este ciclo es uno de los logros más grandes. Al igual que mi familia y amigos cercanos que estuvieron presentes siempre para ayudarme, darme aliento, soporte y ánimos para seguir adelante.

Agradezco el apoyo que recibí de los profesores Randall Chaves y Laura Brenes; que a lo largo del desarrollo de este proyecto (y de la carrera) ambos estuvieron siempre pendientes e interesados en mi crecimiento y desarrollo.

Asimismo, también agradezco a la profe Carolina Guadamuz y Carlos Gómez al ser un apoyo enorme en temáticas relacionadas al desarrollo de los objetivos en planta.

Además, extendiendo un sincero agradecimiento a CoopeTarrazú R.L, especialmente a Jimmy Porras, por creer en mi propuesta y en mis capacidades; de igual forma por el apoyo a lo largo del proyecto.

Por último, gracias al CIPA y CEQIATEC por prestar sus servicios/equipos para la ejecución de este proyecto.

Resumen

Las aguas mieles son aguas residuales provenientes del beneficiado en húmedo del café; específicamente generadas durante el desmucilaginado. Este efluente tiene un alto contenido de materia orgánica que provoca problemas ambientales; además de poseer compuestos orgánicos que pueden ser recuperados. En CoopeTarrazú R.L se generan en cada temporada de cosecha cerca de 19 millones de litros de aguas mieles. Estas son tratadas según la legislación ambiental existente en Costa Rica, pero este tratamiento no sigue un proceso de economía circular. La empresa en la actualidad no cuenta con un procedimiento para la recuperación de este material.

Como alternativa para su aprovechamiento, en este trabajo se realizó la extracción de las sustancias pécticas contenidas en el mucílago presente en las aguas mieles. Además, se realizaron tres tomas de muestras a lo largo de la época de cosecha 2022-2023; los cuales fueron: inicio de cosecha (IC), pico de cosecha (PC) y final de cosecha (FC). Primeramente, se caracterizó este material por medio de un análisis fisicoquímico, tomando en cuenta la medición de pH, °Brix y densidad. Luego se realizó la extracción de pectinas por medio de una hidrólisis ácida catalizada por ácido cítrico. Por último, se comprobó la funcionalidad de la pectina extraída por medio de una prueba de funcionalidad aplicada en un producto alimenticio, con el fin de medir la viscosidad que aporta.

La mayor densidad se reportó en pico de cosecha (PC) ($1,0306 \pm 0,0634$) g/mL; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la densidad del mucílago obtenido a lo largo de la época de cosecha. Por otro lado, el comportamiento de los °Brix fue: IC ($4,8 \pm 0,3$), PC ($5,4 \pm 0,2$) y FC ($5,0 \pm 0,1$); asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre el contenido de sólidos solubles de IC y FC. El pH si presentó diferencias significativas en los tiempos de cosecha, siendo el mayor FC con ($4,80 \pm 0,01$). Con respecto al análisis microbiológico, para todas las muestras se encontró la presencia de microorganismos, sobre todo de hongos filamentosos, levaduras y bacterias patógenas.

Al realizar la extracción de pectinas, el mayor rendimiento de extracción se logró con la muestra recolectada durante el IC con 5,2781 g de pectina/1L de agua miel. Por lo cual se determinó que es posible recuperar las sustancias pécticas contenidas en el mucílago presente en las aguas mieles. Además, presentó propiedades gelificantes, otorgando viscosidad al aplicarla en un producto

alimenticio; sin embargo, generó menor viscosidad en comparación a la pectina comercial. Por ello, se recomienda seguir investigando esta opción para la valorización de las aguas mieles, principalmente en métodos para la extracción de pectinas y la formulación del producto final.

Palabras clave: mucílago de café, recuperación de residuos, beneficiado en húmedo, pectina, hidrólisis ácida, análisis fisicoquímico, análisis microbiológico, biopolímero y viscosidad.

Abstract

Coffee wastewater comes from its wet processing; specifically generated during demucilagination. This effluent has a high content of organic matter that causes environmental problems; in addition to having organic compounds that can be recovered. In CoopeTarrazú R.L, about 19 million liters of wastewater are generated each harvest season. These are treated according to existing environmental legislation in Costa Rica, but this treatment does not follow a circular economy process. The company currently does not have a procedure for the recovery of this material.

As an alternative for its use, in this work the extraction of the pectic substances contained in the mucilage present in the wastewater was carried out. In addition, three samples were collected throughout the 2022-2023 harvest season; which were: beginning of harvest (IC), peak of harvest (PC) and end of harvest (FC). Firstly, this material was characterized by a physicochemical analysis, considering the measurement of pH, °Brix and density. Then the pectin extraction was carried out with an acid hydrolysis catalyzed by citric acid. Finally, the functionality of the extracted pectin was verified by a functionality test applied to a food product, to measure the viscosity it provides.

The highest density was reported at harvest peak (PC) (1.0306 ± 0.0634) g/mL; however, no significant differences were found in the density of the mucilage obtained throughout the harvest season. On the other hand, the behavior of the °Brix was: IC (4.8 ± 0.3), PC (5.4 ± 0.2) and FC (5.0 ± 0.1); Likewise, no significant differences were found between the soluble solids content of IC and FC. The pH did present significant differences in harvest times, being the highest FC with (4.80 ± 0.01). Regarding the microbiological analysis, for all the samples the presence of microorganisms was found, especially filamentous fungi, yeasts, and pathogenic bacteria.

When performing the pectin extraction, the highest extraction yield was achieved with the sample collected during the IC with 5.2781 g of pectin/1L of wastewater. Therefore, it was determined that it is possible to recover the pectic substances contained in the mucilage available in the coffee wastewaters. In addition, it presented gelling properties, giving viscosity when applied to a food product; however, it generated lower viscosity compared to commercial pectin. For this reason, it

is recommended to continue investigating this option for the recovery of biocompounds from wastewater, mainly methods for the extraction of pectin and the formulation of the final product.

Keywords: coffee mucilage, waste recovery, wet milling, pectin, acid hydrolysis, physicochemical analysis, microbiological analysis, biopolymer, and viscosity.

Índice General

Hoja de Aprobación del Trabajo Final de Graduación	2
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Resumen.....	5
Abstract.....	7
Índice General.....	9
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras.....	13
Capítulo I. Introducción	15
1.1 El problema y su importancia	15
1.2 Antecedentes del problema	17
1.3 Objetivos	19
1.3.1 Objetivo General.....	19
1.3.2 Objetivos Específicos.....	19
Capítulo II. Marco Teórico	20
2.1 Generalidades del café	20
2.1.1 Producción de café en Costa Rica	20
2.1.2 Morfología del fruto de café.....	22
2.1.3 Procesamiento del café	24
2.2 Subproductos del beneficiado húmedo del café.....	26
2.3 Caracterización de aguas mieles	29
2.3.1 Caracterización fisicoquímica	29
2.3.2 Caracterización microbiológica.....	29

2.4 Pectinas.....	30
2.4.1 Estructura y composición	31
2.4.2 Usos de las pectinas.....	32
2.4.3 Métodos de extracción.....	34
2.4.4 Extracción de pectinas del mucílago de café.....	36
2.4.5 Caracterización de pectinas	38
Capítulo III. Metodología	42
3.1 Enfoque de la investigación	42
3.2 Tipo de investigación	42
3.3 Marco espacial y temporal	43
3.4 Sujetos de información.....	44
3.5 Fuentes de información	45
3.6 Variables o atributos de la investigación.....	45
3.7 Herramientas	49
3.8 Sistematización de objetivos	55
Capítulo IV. Resultados y Discusión de Resultados.....	62
4.1 Caracterización fisicoquímica.....	62
4.1.1 Densidad.....	62
4.1.2 Concentración de sólidos solubles.....	64
4.1.3 pH	66
4.2 Análisis microbiológico	69
4.3 Extracción de pectina	73
4.3 Viscosidad	76
Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones.....	79
5.1 Conclusiones	79

5.2 Recomendaciones.....	79
Capítulo VI. Bibliografía	81
Capítulo VII. Apéndices y Anexos	89
7.1 Apéndices.....	89
Apéndice A. Fotografías de análisis fisicoquímico realizado en el laboratorio al mucílago de café obtenido de las aguas mieles.	89
Apéndice B. Fotografías proceso de extracción de pectinas.	92
Apéndice C. Fotografías de la prueba de viscosidad.	96
7.2 Anexos.....	97
Anexo A. Hoja de seguridad del ácido cítrico	97
Anexo B. Hoja de seguridad del ácido cítrico.....	98

Índice de Tablas

Tabla 1. Producción en fanegas de café fruta por región cafetalera en Costa Rica, cosecha 2021-2022 ...	21
Tabla 2 Composición fisicoquímica de la pulpa de café como subproducto (Coffea arabica L., variedad Catuai rojo 99)	27
Tabla 3 Características de las aguas mieles del beneficiado en húmedo de café.....	28
Tabla 4 Análisis microbiológico en mucílago de café (proveniente de aguas mieles).	30
Tabla 5 Pruebas cualitativas de identificación de la pectina según la USP	38
Tabla 6 Variables o atributos de la investigación	46
Tabla 7. Equipos, instrumentos y reactivos necesarios para el análisis fisicoquímico.	49
Tabla 8 Equipos, instrumentos y reactivos necesarios para extracción de pectinas.....	51
Tabla 9 Equipos, instrumentos y reactivos necesarios para medición de viscosidad.....	53
Tabla 10 Codificación de las muestras de mucílago de café según tiempo de cosecha; Error! Marcador no definido.	
Tabla 11. Análisis microbiológicos y su respectivo procedimiento.....	58
Tabla 12 Densidad indirecta promedio del mucílago de café según tiempo de cosecha	62
Tabla 13 °Brix promedio del mucílago de café según tiempo de cosecha.....	64
Tabla 14 Resultado comparación en parejas de prueba Tukey para °Brix del mucílago de café según tiempo de cosecha	65
Tabla 15 Resultado comparación en parejas de prueba Tukey para pH del mucílago de café según tiempo de cosecha	68
Tabla 16 Resultados análisis microbiológico mucílago de café IC	69
Tabla 17 Resultados análisis microbiológico mucílago de café PC	70
Tabla 18 Resultados análisis microbiológico mucílago de café FC	71
Tabla 19 Resultado comparación en parejas de prueba Tukey para el rendimiento de extracción.....	75
Tabla 20 Resultados de viscosidad promedio	76
Tabla 21 Resultado comparación en parejas de prueba Tukey para la viscosidad según formulaciones ...	77

Índice de Figuras

Figura 1 Ventas de café para exportación cantidades y precios para la cosecha 2021-2022.....	22
Figura 2 Morfología del fruto del café.....	23
Figura 3 Estructura básica molecular de la pectina	32
Figura 4 Imagen satelital de oficinas centrales de CoopeTarrazú R.L.	43
Figura 5 Imagen satelital de Planta Piloto Agroindustrial, TEC.	44
Figura 6 Desmucilagadora Penagos DVX-4 de donde se obtienen las muestras de aguas mieles en el Beneficio Central CoopeTarrazú R.L.....	55
Figura 7 Diagrama de proceso para extracción de pectina del mucílago contenido en las aguas mieles	60
Figura 8 Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para la densidad del mucílago de café según tiempo de cosecha	63
Figura 9 Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para los °Brix del mucílago de café según tiempo de cosecha	64
Figura 10 Valores de pH del mucílago de café según tiempo de cosecha.....	66
Figura 11 Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para el pH del mucílago de café según tiempo de cosecha	67
Figura 12 Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para el rendimiento de extracción.....	74
Figura 13 Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para la viscosidad según formulaciones	77
Figura 14 Evidencia determinación densidad indirecta del mucílago de café.....	89
Figura 15 Evidencia medición el pH del mucílago de café	90
Figura 16 Recipiente estéril para toma de muestras microbiológicas.....	90
Figura 17 Evidencia filtración de las aguas mieles.....	91
Figura 18 Evidencia primer centrifugado	92
Figura 19 Evidencia del filtrado al vacío.....	93
Figura 20 Evidencia del precipitado de pectina.....	93
Figura 21 Evidencia proceso de liofilización de la pectina	94
Figura 22 Pectina extraída en contraste con pectina comercial	95

Figura 23 Evidencia medición de viscosidad.....	96
Figura 24 Hoja de seguridad del ácido cítrico	97
Figura 25 Especificaciones internacionales de la calidad de pectina	98

Capítulo I. Introducción

El café es un cultivo leñoso C3 (DaMatta, Avila, Cardoso, Martins, & Ramalho, 2018) de origen africano, introducido en Costa Rica entre 1796 y 1798 (Alfaro, 2015). Es uno de los cultivos que posee mayor aporte económico en países subdesarrollados. El 99% de la producción mundial se centra en especies del género *Coffea* conocidas como café Arábica y café Robusta, produciendo aproximadamente US\$ 173.000 millones en términos de su cadena de valor/abastecimiento (DaMatta, Avila, Cardoso, Martins, & Ramalho, 2018). Su consumo realmente ha tenido poco tiempo en la historia de la humanidad. Su inicio data en el siglo 17, siendo en la actualidad una de las bebidas más consumidas en el mundo. Anudado a ello, aporta un movimiento económico relevante a cientos de economías en todos los continentes (Yeretzian, 2017).

El cultivo de café tiene un alto impacto socioeconómico en los países latinoamericanos (Carvalho, Carvalho, & Souza, 2019) y Costa Rica no es la excepción, incluyendo actores a lo largo de su agrocadena, desde productores hasta torrefactores y comerciantes.

Al igual que en todas las actividades agropecuarias, el procesamiento del café genera subproductos que ocasionan un impacto negativo al ambiente si no son tratados correctamente. Asimismo, el aprovechamiento de estos materiales se enmarca en el concepto de economía circular. En este contexto, CoopeTarrazú realiza constantes esfuerzos para la recuperación y aprovechamiento de los subproductos que genera a lo largo de su cadena productiva, en el procesamiento del café. Uno de los subproductos es el mucílago, el cual comúnmente pasa a formar parte de las aguas mieles. Por tanto, este proyecto pretende apoyar las iniciativas de CoopeTarrazú sobre la búsqueda de alternativas de aprovechamiento. En este caso, mediante la extracción de pectinas, a partir del mucílago desprendido durante el beneficiado en húmedo.

1.1 El problema y su importancia

CoopeTarrazú R.L es una cooperativa que procesa café como una de sus principales actividades. Dentro de su proceso de beneficiado en húmedo se encuentra una etapa unitaria llamada desmucilaginado, la cual tiene como objetivo remover el mucílago presente en el fruto de café. En este caso, el proceso se realiza mecánicamente con la ayuda de una desmucilagadora, la cual

remueve esta capa gelatinosa por medio de un golpeteo constante del fruto despulpado contra sus paredes internas. Durante dicho proceso un flujo continuo de agua permite precisamente lavar las semillas; lo que genera dos salidas importantes: los granos de café desmucilaginado y aguas residuales que contienen parte de la materia orgánica lavada, estas últimas también se les conoce como aguas mieles. La evidencia de su alto contenido de materia orgánica se refleja en mediciones de DQO y DBO en donde presentan 9270-14800 mg/ml y 472-551 mg/L respectivamente (Rattan, Parande, Nagaraju, & Ghiwari, 2015).

Según la empresa, en cada cosecha se generan alrededor de 19 millones de litros de aguas mieles. Actualmente este subproducto es tratado según el decreto DGS-801-09 del Ministerio de Salud Pública de Costa Rica. Dicha normativa exige el tratamiento de las aguas residuales del beneficiado en húmedo, mediante la aspersión de estas en campos de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) que poseen características topográficas específicas. Además, indica una minimización obligatoria en el uso del agua. Esta debe ser menor a 1 m^3 por fanega cuando se esté realizando el desmucilaginado y preferiblemente menor a 500 L por fanega (con el fin de generar lodos). Adicionalmente, se exige pretratamientos de este residuo como el tamizado previo a su uso. Sin embargo, este procedimiento solamente se puede llevar a cabo durante la época seca en los meses de noviembre a abril, presentando una limitación temporal (ICAFÉ, 2009).

A pesar de que se cumple con la legislación vigente, la Cooperativa no presenta un aprovechamiento circular de los subproductos generados en esta operación unitaria. Por ello, es que se identifica la necesidad, desde una perspectiva ambiental y de economía circular, de evaluar opciones para el aprovechamiento de este actual residuo agroindustrial; y que incluso pueda generar futuros ingresos a la cooperativa y sus asociados.

Entre las opciones existentes para el aprovechamiento de las aguas mieles, se considera la extracción de pectina al ser de particular interés para la Cooperativa. Se toma la decisión de seguir esta línea de investigación basada en la proporción de mucílago que tiene la cereza de café, que según la empresa es de 39,5 kg de mucílago por fanega. A su vez, alrededor de un 30% de la composición de esta capa gelatinosa son sustancias pécticas (Avallone, Guiraud, Guyot, Olguin,

& Brillouet, 2000). Partiendo de lo anterior, es llamativa la extracción de la pectina presente, para así evaluar su posible uso industrial posteriormente.

La iniciativa de extracción de pectinas se respalda debido a la necesidad de mercado que existe en Costa Rica por este aditivo alimentario. La demanda que tiene el país de sustancias pécticas se satisface casi en su totalidad por importaciones. En el 2021 PROCOMER reportó la importación de 67,2 toneladas de materias pécticas, pectinatos y pectatos. Dichos materiales se envían a territorio nacional desde países como Alemania, Bélgica, Brasil, México y China; siendo este último uno de los mayores importadores de este aditivo a Costa Rica. Satisfacer cierta parte de la demanda nacional de pectinas puede ser una opción de mercado para la cooperativa (PROCOMER, 2023).

1.2 Antecedentes del problema

La actividad cafetalera aportó en el 2020 un 4,24% al PIB agrícola y un 3,19% del PIB agropecuario costarricense. Además, proporcionó USD\$ 322 158 299 en divisas al país en la cosecha 2020-2021. De estos ingresos que se generaron, un 2,3% corresponde a las exportaciones totales y un 9,7% de las exportaciones de productos agropecuarios (ICAFFE, 2021). La producción nacional del periodo 2020-2021 se registró en 1 886 594,04 “2 Dhl” (fanegas) de café fruta, los cuáles se dividen entre las siete regiones cafetaleras de Costa Rica: Coto Brus, Los Santos, Pérez Zeledón, Turrialba, Valle Central, Valle Occidental y Zona Norte. La región de Los Santos, a la cual pertenece CoopeTarrazú R.L., fue la de mayor producción, pues presentó 795.124 “2 Dhl” (fanegas) de café fruta (ICAFFE, 2021).

La producción, procesamiento y comercialización de este grano se integra en una agrocadena, que posee varios eslabones que precisan de un intensivo uso de recursos humanos, siendo generadora de empleos y motor de la economía en muchas regiones. Se benefician de esta tanto los productores y sus familias como los últimos eslabones de la agrocadena (distribuidores y comerciantes) (ICAFFE, 2021). El beneficiado del café es el proceso agroindustrial por el cual se recibe la fruta del café y se obtiene el grano limpio y seco, listo para seguir con su procesamiento especializado. Dentro de este proceso se cuenta con la etapa unitaria llamada desmucilaginado en donde se retira

el mucílago de la semilla y así se obtiene el café pergamino (Gómez, 2019). De esta etapa se obtiene como residuo las aguas mieles, que contienen todo el mucílago extraído, además de otros compuestos orgánicos e inorgánicos procedentes del mismo lavado de la semilla.

Entre los actores del proceso de beneficiado mencionado anteriormente, en Costa Rica, se encuentra la cooperativa de productores de café CoopeTarrazú R.L., ubicada en San Marcos de Tarrazú. Dicha organización ha velado por el sector cafetalero desde 1960. Ha luchado para que este cultivo tenga mayor representación a nivel nacional y cuente con avances tecnológicos. Después de más de 60 años de trayectoria, en la actualidad la cooperativa cuenta con 5 000 asociados, y poseen la capacidad de procesar 300 000 quintales de café cereza (CoopeTarrazú, 2022).

El departamento de Investigación Desarrollo e Innovación de CoopeTarrazú R.L tiene como objetivo dar un aprovechamiento a los subproductos del café, tanto para innovar en el tratamiento de estos, como para ofrecer nuevas técnicas y productos a los miembros de la cooperativa y al sector cafetalero en general. Entre ese aporte a la innovación, está el compromiso por dar un aprovechamiento a los subproductos de la actividad cafetalera. Para ello, se han desarrollado productos como: Delipulpa (suplemento para ganado a base de pulpa seca del café), etanol de la broza de café, harina de café, compost de pulpa de café y otros proyectos (CoopeTarrazú, 2022).

Sin embargo, con respecto a las aguas mieles, esta organización aún no posee un aprovechamiento establecido, y no han realizado investigaciones previas en este campo. Si bien este subproducto se trata según la legislación vigente, lo cual logra reducir el impacto ambiental negativo, no se sigue un lineamiento de economía circular. Por ello, la misma Cooperativa desea incursionar en la investigación de opciones para su valorización bajo un modelo de economía circular. Mendoza (2016) reporta éxito en la extracción de pectina contenida en el mucílago de las aguas mieles, obteniendo rendimientos entre 9 a 20%, por lo que, partiendo de este antecedente y el interés de la cooperativa, es que se propone el presente Trabajo de Graduación para realizar dicho procedimiento en la empresa.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Extraer pectinas a partir del mucílago presente en las aguas mieles del beneficiado del café en CoopeTarrazú R.L, a lo largo de la temporada de cosecha, como alternativa de aprovechamiento de este residuo agroindustrial.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar el mucílago contenido en las aguas mieles por medio de pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, que permitan la determinación de la presencia de pectina.
2. Realizar la extracción de pectinas contenidas en el mucílago de café, a lo largo de la temporada de cosecha, mediante hidrólisis ácida.
3. Comprobar la funcionalidad, como aditivo alimentario, que posee la pectina extraída de las aguas mieles del beneficiado del café, mediante su aplicación en un producto alimentario.

Capítulo II. Marco Teórico

2.1 Generalidades del café

El café, taxonómicamente, pertenece a la familia *Rubiaceae*; siendo el género *coffea* el correspondiente a esta planta (ICO, s. f.). Este es un cultivo leñoso C3 de origen africano (DaMatta, Avila, Cardoso, Martins, & Ramalho, 2018), que se desarrolla en las regiones tropicales del mundo (ICO, s. f.). La altitud óptima de cultivo se encuentra entre los 500 y 1700 m s. n. m. Las precipitaciones anuales limitan el crecimiento del cafeto, en donde menos de 1000 mm anuales pueden disminuir los rendimientos en cosecha; sin embargo, precipitaciones mayores a 3000 mm ocasionan una disminución en la calidad de los granos (ICAFFE, 2011). Por otro lado, la temperatura media anual debe mantenerse entre 15-24 °C (ICO, s. f.) y la humedad relativa debe mantenerse inferior al 85% (ICAFFE, 2011).

La bebida de café es una de las más consumidas a nivel mundial (Galanakis, 2017), además su aporte a la economía de países en desarrollo es considerable (Yeretzian, 2017). Las dos especies que dominan la producción mundial son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (café Robusta), ocupando así el café arábico cerca de un 60% del mercado mundial (ICO, s. f.). Asimismo, los esfuerzos por llevar a cabo mejoras genéticas en estos cultivares son la prioridad de varios entes dedicados a la producción de este fruto, lo cual realizan por medio de hibridación y cruzamientos genéticos. Así es como se obtienen variedades adaptadas a las condiciones agroclimáticas específicas de cada región (Galanakis, 2017).

2.1.1 Producción de café en Costa Rica

El café de Costa Rica es reconocido a nivel mundial por ser de calidad y aportar características organolépticas óptimas; esto se debe a que es 100% fruto del cafeto de la especie Arábica. En Costa Rica más del 80% de la producción cafetalera se localiza en regiones con condiciones óptimas para el desarrollo del cultivo como: una altitud entre 800 y 1600 m s. n. m., temperaturas entre 17-28 °C y precipitaciones entre 2000-3000 mm anuales. Por último, con tal de conservar la

más alta calidad, en el país se utiliza el método manual y selectivo durante la cosecha del fruto y el beneficiado se realiza mayormente por vía húmeda (ICAFE, s. f.).

Las variedades que predominan en Costa Rica son Caturra y Catuaí, ambas de la especie *Coffea arabica* (ICAFE, s. f.). La variedad Caturra es una planta compacta, apta para las condiciones y calidad estándar de Centroamérica. Por otro lado, la variedad Catuaí es un cruce genético entre Mundo Novo y Caturra, por lo que comparten varios aspectos. Es por ello que, ambas poseen un porte bajo, una coloración del brote de hoja verde, un tamaño del fruto promedio, un buen potencial de rendimiento. A pesar de todas estas características positivas, ambas variedades son susceptibles a la roya, antracnosis de la cereza (CBD) y a nematodos (World Coffee Research, 2023).

Con respecto a la producción nacional, para el periodo de cosecha 2021-2022 se cosecharon 1 672 509,55 fanegas (Dhl2) de café fruta (ICAFE, 2022). Dicha producción se repartió entre las siete regiones cafetaleras del país como se muestra en la Tabla 1. Igualmente, se observa que la región cafetalera de Los Santos, a la cual pertenece CoopeTarrazú R.L, es la que mayor producción presenta a nivel nacional.

Tabla 1

Producción en fanegas de café fruta por región cafetalera en Costa Rica, cosecha 2021-2022.

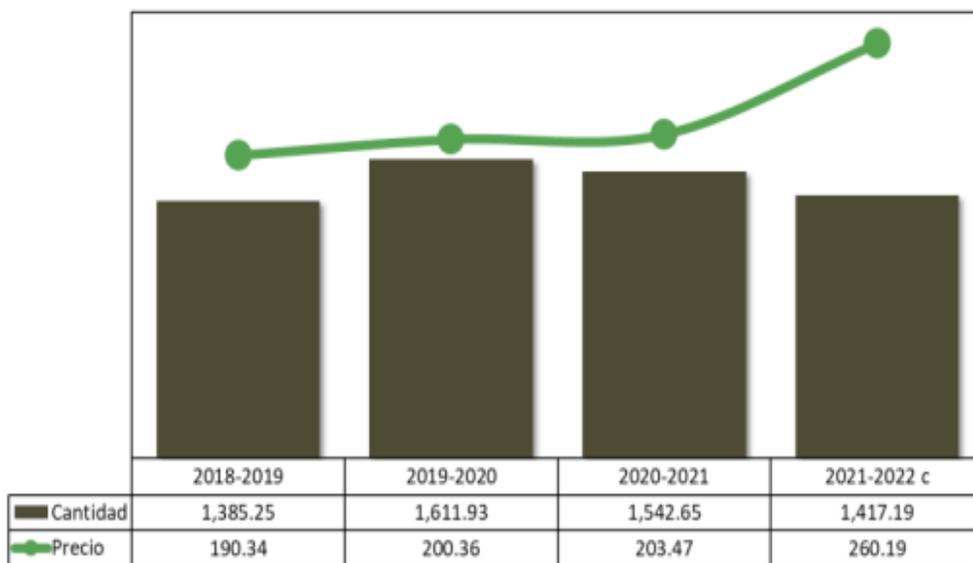
Región cafetalera	Fanegas (2 Dhl)
Coto Brus	152,656
Los Santos	674,838
Pérez Zeledón	217,849
Turrialba	53,771
Valle Central	227,950
Valle Occidental	331,378
Zona Norte	14,068

Nota: Ajustado de Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica, por ICAFE, 2022.

En cuanto a las ventas por exportación, para la cosecha 2021-2022 se vendieron 1 417 188 sacos de 46 kg, con un precio de USD 260,19/46 kg (precio rieles). Esto significa que, a pesar de no tener la mayor exportación histórica, si se obtuvo el mejor precio histórico con respecto al precio del café de exportación (ICAFFE, 2022). Esta comparación histórica se puede observar en la Figura 1.

Figura 1

Ventas de café para exportación cantidades y precios para la cosecha 2021-2022.



a/ Cantidades en miles de sacos de 46 kg.

b/ Precio rieles en USD/46 kg. c/ Cifras sujetas a ajuste.

Tomado de Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica, por ICAFFE, 2022.

2.1.2 Morfología del fruto de café

La estructura del fruto de café consiste en 4 capas que protegen la semilla. Según Galanakis (2017), su morfología presenta el siguiente orden de afuera hacia dentro:

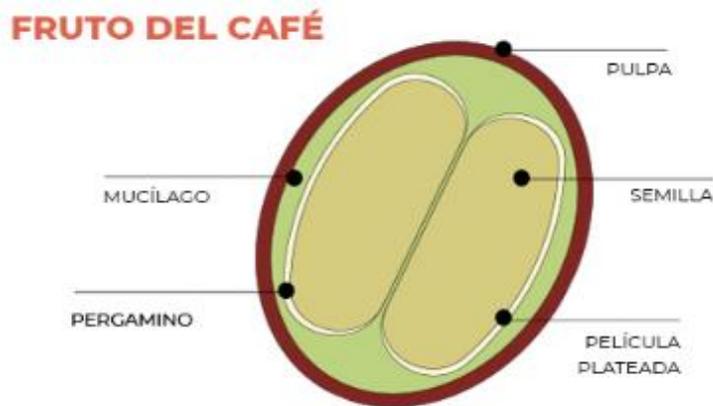
1. La pulpa o cáscara (epicarpio o exocarpo), consiste en una cobertura mono celular cubierta de una sustancia cerosa, cuando el fruto se madura, esta se torna roja o amarilla dependiendo de la variedad utilizada.

2. Mesocarpio, mayormente conocido como mucílago. Esta se compone de una capa gelatinosa.
3. Pergamino (endocarpio), una capa delgada de polisacáridos.
4. Película plateada, una delgada cobertura que cubre directamente las semillas.
5. La semilla de café.

En la Figura 2 se observa la morfología del fruto de café y las partes anteriormente descritas.

Figura 2

Morfología del fruto del café.



Tomado de: CESMACH.

De las partes del fruto del café, el mucílago es de interés para este proyecto, ya que, en términos de subproductos generados durante el beneficiado del café, el mucilago se encuentra en las aguas mieles, actual objeto de estudio en la presente investigación. El mucílago o mesocarpio es una capa gelatinosa que posee el fruto o cereza del café. Se tipifica como un coloide, el cual posee una gran capacidad de retención hídrica; sin embargo, su composición puede variar según las condiciones agro-climatológicas. Esta capa queda expuesta luego de realizar el despulpado, y es removido durante la desmucilaginación (Márquez & Lesdesma, 2020).

El mucílago posee entre un 29-36% de sustancias pécticas en base seca, siendo variables dependiendo de las condiciones de crecimiento del café e incluso del tratamiento de desmucilaginado. Asimismo, presenta entre un 82,7% a un 83,7% de carbohidratos en base seca, siendo los azúcares reductores los que más presencia tienen (47,9%). Además, posee en promedio un 29,8% de azúcares no reductores y un 7,3% de fibra (Puerta & Ríos, 2014).

2.1.3 Procesamiento del café

El procesamiento del café comienza con la cosecha del fruto maduro; el cuál se torna rojizo o amarillento. Dependiendo de las variedades utilizadas, puede tomar entre 3 a 4 años para que un cafeto produzca su primera cosecha (Jiménez-Castro, 2013). En el caso de Costa Rica, se da solamente una cosecha anualmente, empezando en julio para las zonas de maduración temprana (Turrialba y Orosi) y terminando entre los meses de febrero y marzo. Para la zona de Los Santos, a la cual pertenece CoopeTarrazú R.L., la cosecha se da entre noviembre y marzo (ICAFE, 2023).

La recolección del fruto generalmente se hace de forma manual, método que permite escoger los frutos individualmente, seleccionando solo aquellos que estén maduros. No obstante, representa un alto rubro en los costos de producción (Jiménez-Castro, 2013). Los frutos recolectados pasan a la etapa de recibo, en donde los productores los transportan lo antes posible para evitar el deterioro de estos (Galanakis, 2017). Las cerezas de café se reciben en los beneficios, lugar donde se realizará su procesamiento. Este procesamiento es llamado beneficiado, este se puede realizar por vía seca o húmeda (Jiménez-Castro, 2013).

Al realizar dicho procesamiento por vía seca se denomina beneficiado en seco, característico por ser un método tradicional. Actualmente, se sigue utilizando en muchas regiones cafetaleras del mundo donde el recurso hídrico es limitado. Se comienza extendiendo las cerezas recién recolectadas en una superficie plana, para ser secadas por el sol. Para evitar el deterioro del fruto, estos reciben volteos, varias veces al día y durante la noche o si se presenta lluvias, se cubren para evitar que se humedezcan. Este secado puede tardar varias semanas, hasta que alcance una humedad de aproximadamente 11% (Jiménez-Castro, 2013). Luego, se realiza un solo despulpado,

en donde por el proceso previo de secado, se logra retirar todas las capas que posee la cereza en esta etapa unitaria (pericarpio), exponiendo de una vez la semilla de café seca, lista para ser almacenada, molida o continuar en la línea de producción dependiendo del producto que se desee obtener (Galanakis, 2017).

Por otro lado, también se puede realizar el beneficiado en húmedo, en donde se da esta industrialización del café con la ayuda de un flujo de agua en todas sus etapas unitarias; ya que se facilitan las labores durante el proceso, como el lavado, movilización del fruto y remoción de subproductos (Fuentes, 2019). Asimismo, este sistema es ampliamente utilizado, ya que no solo facilita las labores; si no que permite una mayor calidad del café procesado (Jiménez-Castro, 2013).

Al beneficiar en húmedo se comienza con la recepción de la cereza de café, estas se introducen en una tolva para realizar una remoción de objetos extraños como piedras o ramas; por medio de diferencia de pesos (sumergidas en agua) el fruto del café flota mientras las piedras, frutos dañados y otros objetos pesados precipitan al fondo. Siguiendo el mismo flujo de agua, el fruto cae en la despulpadora o “chancador” donde unos rodillos calibrados ejercen presión sobre ellos y logran separar el grano de la pulpa; esta última es retirada por medio de bandas transportadoras (Fuentes, 2019).

Luego del despulpado, sigue la etapa donde se generan las aguas mieles, también llamada desmucilaginado. Este se puede realizar por medio de una fermentación durante 12-48 horas, y la acción enzimática de microorganismos suaviza esta capa de mucílago, diluyéndola en el agua y por ende retirándola (Fuentes, 2019). Alternativamente, se puede remover mecánicamente; este proceso mecanizado se basa en la centrifugación, para que ese golpeteo de los granos contra unas mallas desprenda el mucílago; y con la ayuda de un flujo constante de agua se retira, generando así las aguas mieles (aguas residuales cargadas del mucílago removido). La desmucilagínación mecánica es preferida por la cooperativa, ya que reduce considerablemente el tiempo de la etapa unitaria, pasando de una fermentación de 12-48 horas, a una remoción del mucílago casi inmediata. Terminada esta etapa, el grano de café pasa al procesamiento en seco y posteriores tratamientos (Márquez & Lesdesma, 2020).

2.2 Subproductos del beneficiado húmedo del café

Dentro del procesamiento del café existen subproductos generados a lo largo del beneficiado en húmedo. Durante los años se ha observado un aumento en la generación de estos materiales residuales, debido al aumento en consumo de café, dentro de los que destacan: granos inmaduros o defectuosos, cáscara/pulpa y aguas mieles. Estos subproductos son una gran alternativa para la recuperación de recursos, tanto energéticos como de biocompuestos disponibles, logrando así una producción circular (Galanakis, 2017).

La presencia de granos maduros o defectuosos se genera directamente por el proceso de recolección del fruto. Estos representan entre 15-20% de la producción de café (Ramalakshmi, Kruba, & Rao, 2007). Los defectos se generan por granos rotos, daño por insectos, frutos de color negro o café y, por último, frutos inmaduros (Galanakis, 2017). En cuanto a contenido de cafeína, estos granos poseen entre 0.8% y 1.8%; además, entre 6.83-8.80% de ácido clorogénico, 32.81-47.15 mg/g de proteína, 7.2-12.7% de contenido lipídico y un contenido de compuestos fenólicos entre 3.04-4.08% (como equivalente a ácido gálico) (Ramalakshmi, Kruba, & Rao, 2007). La recuperación de este subproducto tiene potencial en industrias como la farmacéutica y alimenticia, debido a su composición lipídica y de compuestos bioactivos (Galanakis, 2017).

La pulpa de café es obtenida durante el despulpado del café. En términos generales, la pulpa representa aproximadamente 29% del peso seco de la cereza, y al procesar 2 toneladas de café se genera cerca de 1 tonelada de este subproducto (Murthy & Naidu, 2012). La composición fisicoquímica de la pulpa de café (Tabla 2) evidencia que debido a su naturaleza estructural y de protección de la semilla, existe una considerable concentración de polisacáridos estructurales como la celulosa y lignina (Dias, Melo, Schwan, & Silvia, 2015). Entre los aprovechamientos que se le pueden dar están: compostaje, vermicompost, bio-absorbentes y la producción de bioetanol; sin dejar de lado la recuperación de biocompuestos.

Tabla 2

Composición fisicoquímica de la pulpa de café como subproducto (*Coffea arabica* L., variedad Catuai rojo 99)

Parámetro	Pulpa de café (base seca)
Azúcares totales (%)	9
Azúcares reductores (%)	63
Azúcares no reductores (%)	0.07
Carbohidratos totales (%)	68
Fibra cruda (%)	14
Celulosa (%)	20
Hemicelulosa (%)	6
Lignina (%)	14
Proteína (%)	17-37
Humedad (%)	82

Nota: Ajustado de A new alternative use for coffee pulp from semi-dry process to β -glucosidase production by *Bacillus subtilis*, por Dias, Melo, Schwan y Silvia, 2015.

Las aguas residuales, conocidas como aguas mieles son generadas durante el procesamiento en húmedo, debido al indispensable uso del agua a lo largo del procesamiento; ya que este método de beneficiado garantiza no solo la calidad del producto, sino que lo facilita (Pañuela & Sanz-Uribe, 2021). Estas aguas residuales son de interés para el presente proyecto, ya que, debido a su origen, este efluente contiene el mucílago retirado de la semilla. De ahí su nombre, porque presenta una concentración de varios carbohidratos, entre ellos azúcares simples (Torres, Sanín, Arango, & Serna, 2019). En la Tabla 3 se puede observar las características de las aguas mieles.

Tabla 3

Características de las aguas mieles del beneficiado en húmedo de café

Parámetro	Valor
pH	4,27-4,40
DQO, mg/mL	9 270-14 800
DBO 27 °C, mg/L	472-551
Nitrógeno amoniacal, mg/L	42-57
Nitrógeno nitrato, mg/L	32-48
Fósforo	60-90

Nota: Ajustado de A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing, por Rattan, Parande, Nagaraju y Ghiwari, 2015.

El vertido de estas genera problemas ambientales, principalmente en los mantos acuíferos. Debido a su alto contenido de materia orgánica (Tabla 3), estas conducen a una degradación y provocan que el contenido de oxígeno en el agua disminuya e impide el desarrollo de vida acuática. El mucílago presente en estas aguas residuales tiende a precipitar fuera de la solución, generando una densa capa en la superficie, provocando una obstrucción de las vías fluviales e impidiendo el paso de luz; incrementando aún más las condiciones anaeróbicas. Por otro lado, al generar un ambiente anaeróbico, se crea el ambiente perfecto para el desarrollo de bacterias que producen malos olores y turbidez del agua por la presencia de taninos (Rattan, Parande, Nagaraju, & Ghiwari, 2015).

El aprovechamiento sugerido por la literatura para las aguas mieles es la recuperación de algunos compuestos; entre ellos está: extracción de pectinas, fibra soluble, azúcares de la fruta de café, antioxidantes y flavonoides. Lo anterior se da con el fin de reducir los problemas ambientales ligados a las aguas mieles (Rattan, Parande, Nagaraju, & Ghiwari, 2015).

2.3 Caracterización de aguas mieles

2.3.1 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica logra determinar las características tanto físicas como químicas del producto o agua residual, y con base en ella se elaboran conclusiones acerca de su condición actual (Torres, Sanín, Arango, & Serna, 2019). Las características del mucílago del café pueden ser variables dependiendo del tipo de café, zona de producción y época de recolección, por ello es importante caracterizarla antes de realizar la recuperación de compuestos. Trabajos previos recomiendan realizar la medición de pH con un pH-méetro y grados Brix con un refractómetro (Guerra & Rueda, 2021). Esto se debe a que el pH es un parámetro crucial para el proceso de hidrólisis en la recuperación de pectina del mucílago (Márquez & Lesdesma, 2020). Con respecto a los grados Brix, su determinación se da con el fin de medir la presencia de sólidos disueltos en una solución, siendo de interés por la cantidad de azúcares que posee el subproducto (Guerra & Rueda, 2021). Guerra y Rueda (2021) reportan valores de pH y grados Brix de 4.5 y 7.2 respectivamente. Por otro lado, la densidad también es un parámetro estudiado en la caracterización de las aguas mieles del café, ya que permite determinar la masa suspendida en determinado volumen. Para las aguas mieles se reporta una densidad de 1.0155 g/mL (Mendoza, 2016).

2.3.2 Caracterización microbiológica

Son los análisis realizados al producto en estudio con el fin de determinar la presencia de microorganismos, sobre todo aquellos patógenos o que afecten la vida útil del producto. Identificando los microorganismos presentes se puede determinar la aceptabilidad que tiene el producto bajo los criterios microbiológicos o de inocuidad vigentes (SCIJ, 2018).

Guerra y Rueda (2021) recomiendan realizar un recuento de microorganismos en el mucílago de café, con el fin de determinar la seguridad del producto y calidad de este. Por la naturaleza del subproducto, se pueden encontrar mohos y levaduras, mesófilos aerobios, enterobacterias y coliformes totales. En la Tabla 4, se puede observar los resultados del análisis microbiológico

realizado por Guerra y Rueda (2021); en este se observa una alta carga de mohos y levaduras, la cual se relaciona con el pH ácido (4.5) que poseen las aguas mieles de café. Asimismo, se denota una alta carga de recuento de mesófilos aerobios, que, a pesar de mostrar la presencia de microorganismos patógenos, refleja la posible fermentación por la cual ya están pasando estas aguas residuales al momento de la toma de la muestra (Guerra & Rueda, 2021).

Tabla 4

Análisis microbiológico en mucílago de café (proveniente de aguas mieles).

Ensayo	Método	Resultado	Unidades
Recuento Total de Mesófilos	NTC 4519	$2,3 \times 10^6$	UFC/mL
Recuento de Enterobacterias	NTC 5733	< 10	UFC/mL
Recuento de Coliformes Totales	ISO 4832	< 10	UFC/mL
Recuento de Mohos y Levaduras	NTC 5698-1	$1,0 \times 10^4$ Mohos $4,4 \times 10^3$ Levaduras	UFC/mL

Nota: Tomado de Producción de una biopelícula a partir de las pectinas extraídas del mucílago de café, por Guerra y Rueda, 2021.

2.4 Pectinas

Las pectinas son polisacáridos estructurales que se encuentran en los tejidos vegetales; otorgando integridad, fuerza y flexibilidad a las paredes celulares. Estas cadenas de polisacáridos poseen ramificaciones de azúcares como galactosa, xilosa, arabinosa y ramnosa. Generan matrices en conjunto con otras moléculas como celulosas y hemicelulosas para contribuir en la estabilidad y estructura de las paredes celulares. Su composición es variable, y está ligada a su grado de esterificación; que define sus propiedades funcionales (Masuelli & Blumenberg, 2020).

Se utilizan ampliamente en la industria alimentaria por su capacidad como hidrocoloide; y logra gelificar, estabilizar y espesar productos alimentarios; además de su uso como sustituto de las

grasas en formulaciones. Su funcionalidad se justifica debido a la facilidad que posee la pectina a unirse al agua y generar estos geles, incluso a bajas concentraciones (Ciriminna, Fidalgo, Delisi, Ilharco, & Pagliaro, 2016).

Actualmente la pectina se extrae, mayoritariamente, de residuos de manzana y naranja (Zegada, 2015). Sin embargo, por años se ha tratado de incursionar en la búsqueda de fuentes alternativas para la obtención de pectinas, más que todo con el fin de poder aprovechar diversos subproductos o residuos agroindustriales en los que se encuentran presentes (Chaparro, Márquez, Sánchez, Vargas, & Gil, 2015).

2.4.1 Estructura y composición

El término pectina no hace referencia a una sola estructura de polímero, si no, a una serie de polisacáridos y/o cadenas dominadas por glucano que contienen residuos de ácido galacturónico, presentando uniones en las posiciones 1 y 4. Como se mencionó anteriormente, esta familia de compuestos puede presentar, o no, ramificaciones de azúcares como galactosa, xilosa, arabinosa y ramnosa. Estos azúcares se agregan a la cadena durante la síntesis de pectina por medio de enzimas como: glucuronosiltransferasa, arabinosiltransferasa y xylosyltransferasa. Este proceso de síntesis de pectinas ocurre en el Aparato de Golgi donde también participan las siguientes enzimas: galacturonosiltransferasa, glicosiltransferasa, metiltransferasa y acetiltransferasa (Dranca & Oroian, 2018).

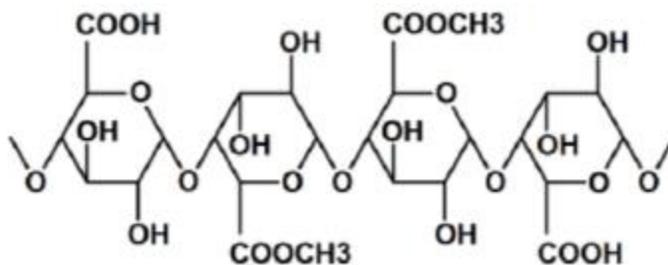
Análisis estructurales realizados en la pectina demuestran una composición de cadenas formadas por aproximadamente entre 100 y 1000 unidades de sacáridos (Masuelli & Blumenberg, 2020), pero de igual manera, no posee una estructura definida; ya que la misma depende significativamente de la edad de la planta o tejido y especie vegetal de la que se extrae este compuesto (Dranca & Oroian, 2018).

A pesar de que las sustancias pécticas poseen diferentes configuraciones, todas pueden someterse a esterificación por grupos metilo (C6) y/o grupos acetilo (O-2, O-3) en la cadena de polisacáridos continua, tomando en cuenta los residuos de ácido galacturónico. Esto es lo que permite

clasificarlas según su grado de sustitución, conocidos como grado de metilación y acetilación, respectivamente (Dranca & Oroian, 2018). Para ejemplificar la estructura general de las pectinas, en la Figura 3 se observa la estructura molecular básica de este biocompuesto.

Figura 3

Estructura básica molecular de la pectina



Tomado de: “Extracción de pectina de residuos de cáscara de naranja por hidrólisis ácida asistida por microondas (HMO)”, por V. Zegada, 2015.

2.4.2 Usos de las pectinas

La gelificación de pectina es un proceso complejo que implica la formación de una red tridimensional de moléculas de pectina, que atrapa agua y otros ingredientes. Las propiedades de gelificación de la pectina dependen del tipo y la concentración de pectina, el pH, la presencia de otros ingredientes y las condiciones de procesamiento. La pectina se usa comúnmente como agente de gelificación en varios productos alimenticios, como mermeladas, jaleas, frutas para untar y postres. La pectina también se puede utilizar como espesante y estabilizador en productos alimenticios. Los geles a base de pectina tienen propiedades únicas, como una alta capacidad de retención de agua, una textura suave y una buena liberación de sabor. Los geles de pectina se pueden modificar agregando otros ingredientes como azúcares, ácidos y proteínas para mejorar su textura y estabilidad (Masuelli & Blumenberg, 2020).

La pectina es un estabilizador efectivo en productos ácidos, como los jugos de frutas, porque es capaz de estabilizar las proteínas y evitar la precipitación (Voragen, Coenen, Verhoef, & Schols,

2009). El mecanismo por el cual la pectina estabiliza los productos alimenticios es a través de enlaces de hidrógeno. La pectina contiene numerosos grupos hidroxilo que pueden participar en los enlaces de hidrógeno con otros componentes de los alimentos. Esto permite que la pectina forme complejos con otras moléculas, como proteínas u otros polisacáridos, que pueden estabilizar aún más un producto alimenticio (Wicker, 2004).

Una de las nuevas aplicaciones de las pectinas es en la industria farmacéutica. Se ha descubierto que tienen propiedades mucoadhesivas, lo que significa que pueden adherirse a la membrana mucosa del cuerpo humano. Esta propiedad hace que sean útiles en los sistemas de administración de fármacos, ya que pueden utilizarse para mejorar la biodisponibilidad y la liberación controlada de estos. Varios tipos de este polímero se han caracterizado por su capacidad de adherirse al tracto gastrointestinal. Este proceso de mucoadhesión implica tres pasos: (1) la humectación y el hinchamiento del polímero para permitir un contacto directo con el tejido biológico, (2) la interpenetración de la cadena del polímero bioadhesivo y luego el entrelazamiento de las cadenas del polímero y mucina, y (3) la formación de enlaces químicos débiles entre cadenas entrelazadas. Por lo tanto, esta propiedad de la pectina se utiliza en la preparación de parches mucoadhesivos, a menudo en combinación con otros polímeros mucoadhesivos como el carbopol y el quitosano (Srivastava & Malviya, 2011).

Por otro lado, los hidrogeles que se forman se han utilizado como agentes aglutinantes y en formulaciones de tabletas de matriz de liberación controlada. Las perlas de pectina preparadas por el método de gelificación ionotrópica se han utilizado como un sistema de administración de fármacos. Esta molécula se ha investigado para ser utilizada como un recubrimiento hidrofílico insoluble para la liberación sostenida. Se ha demostrado que la pectina derivada de la cáscara de naranja es un polímero eficiente que actúa como agente aglutinante durante la formulación de dosificación, mientras que aquella obtenida de la cáscara de mango actuó como un agente con alta capacidad desintegrante (Srivastava & Malviya, 2011).

Otra aplicación emergente es en la industria cosmética. Se ha descubierto que tienen propiedades emulsionantes y estabilizadoras, lo que las hace útiles en la formulación de productos cosméticos como cremas y lociones. Se ha utilizado en el mejoramiento de las características reológicas de

emulsiones con aceite de oliva, debido a sus propiedades gelificantes hidrofílicas (Lupi, y otros, 2015). Asimismo, dichas sustancias pécticas presentaron un efecto antioxidante y estabilizador en formulaciones farmacológicas con palmitato de retinilo, sugiriendo, además, su potencial uso en formulaciones que estén sujetas a degradación por oxidación (Ro, y otros, 2013).

Asimismo, también se está explorando su uso potencial en la producción de películas y recubrimientos biodegradables, dichos recubrimientos están ganando popularidad debido a su naturaleza ecológica y su capacidad para reducir el uso de envases sintéticos. Estas alternativas de empaque brindan una barrera biodegradable y, a menudo, comestible que puede mejorar la calidad de los alimentos, la seguridad y las propiedades de manipulación al reducir la contaminación microbiana, controlar los procesos oxidativos y regular la humedad, el gas, los lípidos y el intercambio volátil. En esta aplicación para recubrimientos las pectinas a menudo se usan solas o en combinación con otros polímeros. También se pueden agregar ingredientes activos a estas películas y recubrimientos para mejorar las propiedades mecánicas y de barrera y proporcionar funcionalidades específicas al producto alimenticio (Lazaridou & Biliaderis, 2020).

Por último, estrictamente hablando sobre los usos emergentes de las pectinas extraídas del mucílago de café, han sido pocas las investigaciones al respecto. Se registra el desarrollo exitoso de películas o *“biofilms”* de pectina electro pulverizada biodegradable (Valdespino-León, y otros, 2021). También Guerrero y Rueda (2021) elaboraron una biopelícula para reemplazar los plásticos *“stretch”* y recomiendan elaborar películas compuestas.

2.4.3 Métodos de extracción

Las pectinas, al estar presentes en la pared celular vegetal, puede extraerse del tejido de cualquier planta; sin embargo, dependiendo de las condiciones, especie y estructura de esta, la disponibilidad de pectinas varía (Masuelli & Blumenberg, 2020). El método más utilizado para la extracción de pectinas es la hidrólisis ácida. Este es un proceso en el cual se utilizan catalizadores ácidos para transformar en monómeros elementales las cadenas de polisacáridos (Márquez & Lesdesma, 2020). Se pueden utilizar ácidos como clorhídrico, fosfórico, cítrico y otros para generar un ambiente ácido que ayude a generar la hidrólisis (Guerra & Rueda, 2021). Este método posee

condiciones que influyen en el rendimiento y calidad de extracción, estos factores son la temperatura, pH, propiedades del solvente, velocidad de difusión, tamaño de partícula y sólidos secos (Marić, y otros, 2018).

La metodología básica para realizar una extracción de pectinas por hidrólisis ácida consiste en someter la materia prima o biomasa en una suspensión de agua caliente, acidificando el medio (el pH óptimo depende de matriz en la que se trabaja), bajo un tiempo determinado. Luego de transcurrir el tiempo determinado, los sólidos no solubles se retiran de la solución, esto por medio de una filtración. Este filtrado se mezcla con alcohol para generar una precipitación. La pectina precipitada es recuperada y purificada con alcohol. Por último, se seca el precipitado y luego es molido. Es importante recalcar que, esta es la metodología básica para la extracción de pectinas; sin embargo, las condiciones pueden cambiar dependiendo de la matriz de la biomasa utilizada y de los instrumentos y reactivos disponibles (Guerra & Rueda, 2021).

La hidrólisis ácida es ampliamente utilizada para la extracción de pectinas en diferentes matrices. Por ejemplo, en la extracción de pectina de las cáscaras de naranja Valencia, se determinó una extracción óptima bajo las siguientes condiciones: 90 °C, 75 minutos y pH 1.5; alcanzando rendimiento de extracción mayores al 10% (Casas-Orozco, Villa, Bustamante, & González, 2015). También, se ha utilizado para la extracción en cáscaras de maracuyá, utilizando HCl como ácido catalizador, bajo una hidrólisis a 90 °C por 45 minutos, luego realizando centrifugados para la separación de sólidos y alcohol etílico al 96% para la respectiva precipitación y lavado (de Moura, Macagnan, de Oliveira Petkowicz, & da Silva, 2020).

Por otro lado, también existen otros métodos emergentes utilizados en la extracción de pectina, sobre todo utilizados para aumentar el rendimiento de extracción (Guerra & Rueda, 2021). Entre ellos se encuentra:

1. Extracción asistida por microondas (EAM): Es una de las tecnologías para la extracción de compuestos que está en crecimiento, sobre todo para la recuperación de biocompuestos presentes en subproductos agroindustriales. La EAM es un método que utiliza la energía de microondas para extraer compuestos específicos, de diferentes matrices, esto en conjunto con solventes. Al aplicar un calentamiento volumétrico, temperatura y presión

localizada, se genera una migración selectiva de compuestos, con rendimientos similares o mejores a las extracciones solo con solventes. Por lo tanto, es un método que reduce el tiempo de extracción y el uso de solventes, en comparación a métodos tradicionales (Rao & Ramalakshmi, 2015). Ha sido utilizada en la extracción de pectina de la cáscara de naranja (*Citrus reticulata*) (Maran y Sivakumar, 2013), del limón (flavedo, albedo y pulpa) (Fishman, Chau, Hoagland, & Hotchkiss, 2006) y de la cáscara de jaca (*Artocarpus heterophyllus*) (Koh, Leong, & Noranizan, 2014).

2. Extracción asistida por ultrasonido (EAU): La EAU se realiza comúnmente en un contenedor que se somete a irradiaciones ultrasónicas a frecuencias mayores a 20 kHz (Kadam, Tiwari, Álvarez, & O'Donnell, 2015). Las ondas de ultrasonido generan la cavitación de burbujas en la matriz vegetal, generando la ruptura de las paredes celulares, y, por ende, un mayor acceso del solvente a los compuestos intracelulares. Este método aumenta la eficacia del solvente al generar una mayor área de contacto con los compuestos de interés (Michail, Sigala, Grigorakis, & Makris, 2016). En la extracción de pectina de tejidos vegetales, se han realizado investigaciones con resultados prometedores en cáscaras de maracuyá (de Oliveira, y otros, 2016), naranja agria (Hosseini, Khodaiyan, Kazemi, & Najari, 2019), subproductos de tomate (Sengar, Rawson, Muthiah, & Kalakandan, 2020) y de los subproductos de *Musa balbisiana* (Maran, y otros, 2017).
3. Extracción por agua subcrítica: Este método para extracción de compuestos utiliza como solvente agua a presión, calentada a una temperatura mayor a su punto de ebullición. La extracción con agua subcrítica provoca una modificación en la constante dieléctrica y polaridad del solvente, potenciando así el proceso de extracción; y sin generar daños en los compuestos biológicos (Chemat & Vian, 2014). Se reporta el uso de esta tecnología en la extracción de pectina en el orujo de manzana y cáscara de cítricos, como una alternativa sostenible, ya que el solvente utilizado es agua (Wang, Chen, & Lü, 2014).

2.4.4 Extracción de pectinas del mucílago de café

La extracción de pectinas ha tenido en los últimos años un auge, debido a sus diferentes aplicaciones. El mucílago de café no ha sido la excepción y en recientes años se ha generado un

interés por la recuperación de este polímero en las aguas mieles (residuales) del beneficiado en húmedo del café, las publicaciones existentes respecto al tema son limitadas; sin embargo, de ellas se puede recuperar la metodología óptima para realizar la extracción por medio de hidrólisis ácida.

La extracción de pectina por hidrólisis ácida sigue siempre el mismo principio, pero la optimización del proceso va a depender del producto con el que se está trabajando. En el caso del mucílago contenido en las aguas mieles de café, se debe tomar en cuenta que se trabaja con una matriz mayormente líquida, con residuos sólidos (ramas, hojas, etc) (Márquez & Lesdesma, 2020).

Se inicia con la toma y preparación de la muestra, en donde se deben recolectar las aguas mieles directamente del efluente de la desmucilagadora mecánica, la muestra debe permanecer en refrigeración a una temperatura inferior a los 8 °C, para evitar el desarrollo microbiológico y deterioro de las pectinas. Luego, se debe preparar la muestra para separar el mucílago diluido de los residuos sólidos, para esto se realiza una filtración. Al filtrado, se le agrega agua destilada a una proporción de 1:0.25 v/v (Márquez & Lesdesma, 2020).

Una vez preparada la muestra (filtrado diluido), se procede a realizar la hidrólisis ácida. Se debe acidificar el medio utilizando ácidos como sulfúrico, tartárico y cítrico, Mendoza (2016) recomienda alcanzar un pH de 3,5 al trabajar con esta matriz. Asimismo, García (2009), recomienda realizar la hidrólisis al mismo pH, a 70 °C por 46 minutos, para obtener el mejor rendimiento de extracción. Lo que concuerda con Guerra y Rueda (2021), que ejecutó una hidrólisis a un pH de 3,5, a 70 °C por 45 minutos.

Luego de hidrolizar la muestra, se deja enfriar a temperatura ambiente. Después, se centrifuga por 15 minutos para así eliminar residuos sólidos. Del centrifugado, se recupera el sobrenadante, y a este se le añade alcohol frío (4 °C) al 96% en una proporción 1:1 v/v, para generar la precipitación de las sustancias pécticas, seguido de una centrifugación por 10 minutos a 4 °C, para así recolectar las pectinas precipitadas. Estas pectinas recuperadas reciben varios lavados con alcohol al 96% (4 °C). Luego, García (2009) realiza un filtrado al vacío, seguido de lavados constantes con alcohol al 96% (4 °C). Por último, se secan las pectinas a 30 °C por 24 horas y luego se muelen (Valdespino-León, y otros, 2021).

Márquez y Ledesma (2022) obtuvieron un rendimiento de extracción de pectina en mucílago de café de 0,13%. Por otro lado, se reportan rendimientos de extracción de 21,83% al utilizar ácido sulfúrico (Guerra & Rueda, 2021) y de 2,2% con ácido clorhídrico (García, 2009). Asimismo, Méndoza (2016), obtuvo rendimientos mayores al 20% utilizando ácido sulfúrico, de 15,35% con ácido tartárico y 9,24% con ácido cítrico; todos demostrando una optimización en la extracción al utilizar un pH de 3.5 durante la hidrólisis ácida. No obstante, ningún autor toma en cuenta la madurez del fruto y el tiempo de cosecha para las respectivas determinaciones.

2.4.5 Caracterización de pectinas

La caracterización de las sustancias pécticas va relacionada a su uso. Las pruebas pueden ser de carácter físico, químico, cualitativo; o bien, una combinación de ellas. Las pruebas cualitativas más empleadas son las impuestas por la farmacopea de los Estado Unidos de América (USP por sus siglas en inglés) (Mendoza, 2016). La USP propone que la pectina presente resultados positivos en las pruebas que se ejecuten (Tabla 5). Por otro lado, diferentes entes a nivel mundial también proponen diferentes parámetros de caracterización, y sobre todo de calidad, en este producto a nivel comercial (Anexo B). Entre estos últimos se pueden encontrar: % de humedad, contenido de nitrógeno, solubilidad, contenido de cenizas, análisis microbiológicos, grado de esterificación, etc.

Tabla 5

Pruebas cualitativas de identificación de la pectina según la USP.

Prueba	Observación	Resultado
Solución de pectina más etanol	Precipitados gelatinosos y traslucido	Positivo
Solución de pectina más NaOH 2N	Gel transparente	Positivo
Gel de prueba dos más HCL 3N	Precipitado gelatinoso incoloro	Positivo

Nota: Tomado de Extracción de pectinas a partir de mucílago contenido en las aguas mieles del beneficiado de café por maceración dinámica y estática, por Mendoza, 2016.

El Codex Alimentarius presenta en la norma CODEX STAN 192-1995 todas las disposiciones que debe cumplir un aditivo alimentario, el cual es uno de los principales usos de la pectina. Indica que se puede utilizar como aditivo permitido en alimentos, aquellos que según pruebas del JECFA no presenten riesgos para la salud de las personas que lo consuman. Además, se establecen los parámetros para ingestión diaria admisible (IDA), dosis máxima de uso y en los casos que aplique, ingestión diaria probable. Siendo esta última crucial cuando se trabaja con alimentos para sectores de la población como diabéticos, personas con restricciones médicas o con regímenes alimentarios líquidos. Para la pectina, solo existen dosis máximas en las fórmulas de continuación (10 000 mg/kg), fórmulas para uso médico especiales destinados a lactantes (2 000 mg/kg) y en alimentos complementarios para lactantes y niños pequeños (10 000 mg/kg). En los demás alimentos permitidos la dosis máxima la limitan las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) (FAO, 2021).

Comercialmente el parámetro más utilizado para la caracterización de las pectinas es el grado de esterificación (GE). Este parámetro se define según la relación existente entre los residuos de ácido galacturónico metilesterificados y las unidades de ácido galacturónico en la pectina. La cantidad y distribución que posean los grupos esterometílicos en la molécula van a determinar las propiedades que posee. El GE se liga estrictamente a la capacidad que tiene la sustancia péctica en generar geles y la fuerza que estos poseen. Por otro lado, también condiciona la solubilidad y el espesamiento que otorga (Mendoza, 2016). El procedimiento para determinar el GE, según Guerra y Rueda (2021) se basa en la ejecución de dos titulaciones, la primera en donde se determina el porcentaje de metoxilación (miliequivalentes que se gastaron) y la segunda para medir la acidez libre (miliequivalentes que se gastaron); luego con ambos insumos se completa la siguiente Ecuación (1):

$$\% \text{ Grado esterificación (GE)} = \frac{\text{meq NaOH (metoxilo)}}{\text{meq NaOH (acidez)} + \text{meq NaOH (metoxilo)}} * 100 \quad 1$$

donde:

meq NaOH (metoxilo) =

miliequivalentes de NaOH consumidos durante la determinación de % metoxilación

meq NaOH (acidez) =

miliequivalentes de NaOH consumidos durante la determinación de acidez

Basado en el grado de esterificación, las pectinas se dividen en dos grandes grupos: pectinas de alto metoxilo (PAM) y pectinas de bajo metoxilo (PBM). En las PAM un porcentaje mayor al 50% de los grupos carboxilo del ácido galacturónico están esterificados con metanol. Se caracterizan por generar geles a un pH entre 2,8 y 3,5 y entre 60 y 70 °Brix. Generalmente estas pectinas no reaccionan con iones de calcio y los tiempos de formación de gel son menores (Mendoza, 2016). Además, generan geles con texturas más elásticas y suaves a temperaturas más elevadas sin desintegrarse (de hasta 95°C) (Márquez & Ledesma, 2020). Cuando se trabaja con este grupo de polímeros, al adicionar azúcar a su medio se logra generar una acción “deshidratante” que favorece la interacción entre polisacáridos de forma hidrófoba, lo que facilita la formación de la estructura tridimensional que rodea a las sacarosas hidratadas (Mendoza, 2016).

Las pectinas de bajo metoxilo son un grupo que poseen un GE menor al 50%. A diferencia de las PAM, las PBM generan geles en presencia de cationes divalentes, generalmente iones de calcio. Para estos polímeros, el gel se forma por enlaces con los iones de calcio, formando así la red tridimensional con los grupos carboxilos. El pH bajo el cual se puede trabajar esta entre 1,0 y 7,0, para estas los °Brix no tienen mayor afectación en su efectividad y esa concentración de azúcares puede ser entre el 0 y 80%. Sin embargo, el factor determinante es la presencia de calcio (40-100 ppm), ya que sin este elemento no se produce la gelificación (Mendoza, 2016). Las estructuras generadas por las PBM son reversibles (Márquez & Ledesma, 2020). Las PAM son ideales para formulaciones alimenticias a base de frutas (mermeladas y conservas), y las PBM generan geles a °Brix menores por lo que se utiliza para preparaciones con un bajo nivel calórico (Mendoza, 2016).

El poder gelificante que otorgan las sustancias pécticas es su mayor virtud, así que la medición de la formación de este gel también es un parámetro utilizado en la industria para caracterizar dichas moléculas. La viscosidad ayuda a medir cuantitativamente el gel formado; sin embargo, se ve afectada por factores como el grado de esterificación, pH, temperatura, concentración de la solución y la presencia de moléculas electrolíticas (Márquez & Lesdesma, 2020). Esta propiedad es definida como la fricción interna que posee un líquido, o también como, la tendencia que posee un líquido a resistir el flujo. Para su medición se utiliza el poise (P). Pero, ya que el Poise es una unidad grande de medición, es común que se utilice el centipoise (cP) (1 Cp equivale a 0,01 P). Al igual que la mayoría de los polisacáridos, las pectinas tienen un comportamiento no Newtoniano y de pseudoplástico. Para llevar a cabo la medición de la viscosidad se puede utilizar un viscosímetro, tomando en cuenta condiciones como las revoluciones por minuto, profundidad de la sonda, tipo de sonda y tiempo de análisis (Bourne, 2002).

Capítulo III. Metodología

3.1 Enfoque de la investigación

El proyecto tiene un enfoque de investigación cuantitativo debido a que, por medio de este se intenta resolver el problema mediante un estudio de datos recolectados, que dan resultados medibles numéricamente. Asimismo, se obtienen respuestas basándose en un tratamiento de datos, logrando establecer pautas de comportamientos o tendencias encontradas (Hernández, Fernández, & Baptista, 2014).

Este estudio se enmarca en el enfoque elegido ya que se realizó una investigación basada en el análisis estadístico de diferentes variables con el fin de determinar si existe una diferencia significativa en la extracción de pectina a lo largo de la cosecha. Asimismo, dentro de los objetivos existen mediciones de laboratorio que generaron información de carácter numérico, susceptibles a la interpretación con métodos estadísticos.

3.2 Tipo de investigación

Tomando en cuenta que se trabajó bajo un enfoque cuantitativo, el tipo de investigación se plantea como exploratorio. Este se utiliza en estudios con objetivos que proponen abarcar un tema con poca base teórica, esto quiere decir, un tema poco estudiado y que, por ende, el proyecto resulta en una indagación acerca de ese tema. Se busca, sobre todo, preparar el terreno para nuevos estudios, formando las bases para seguir desarrollando el tema (Hernández, Fernández, & Baptista, 2014).

El proyecto plantea la indagación en la extracción de pectina del mucílago contenido en las aguas mieles del beneficiado húmedo en CoopeTarrazú R.L. Es un tema que no posee antecedentes dentro de la Cooperativa, por lo que para la organización es innovador. Asimismo, en términos de disponibilidad de estudios tanto a nivel nacional como internacional, realmente la bibliografía es limitada y se necesita apoyar la investigación del aprovechamiento de este residuo.

3.3 Marco espacial y temporal

CoopeTarrazú R.L. está localizada en la comunidad de San Juan de San Marcos de Tarrazú, en la provincia de San José, Costa Rica. Aquí se encuentran tanto las oficinas centrales como su beneficio llamado Beneficio Central CoopeTarrazú R.L. Las coordenadas geográficas para esta ubicación son $9^{\circ}39'19''\text{N}$ $84^{\circ}01'10''\text{O}$. En este beneficio es donde se da el procesamiento del café y en donde se van a recolectar las muestras de aguas mieles. A continuación, se adjunta una imagen satelital donde se observa la localización de la empresa.

Figura 4

Imagen satelital de oficinas centrales de CoopeTarrazú R.L.

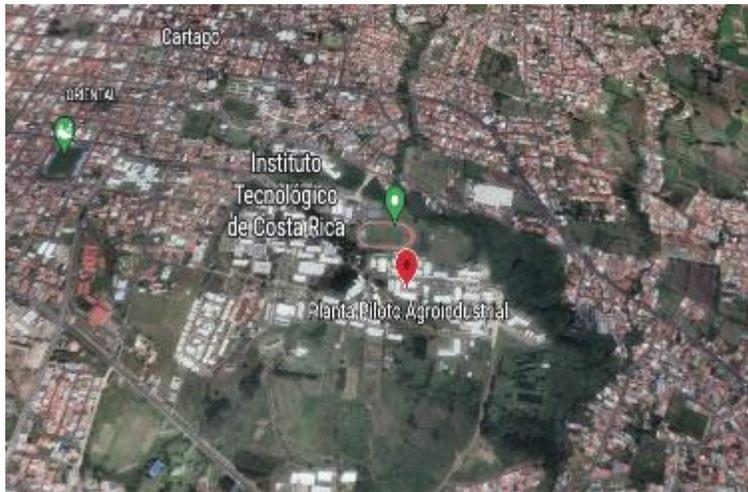


Tomado de: Google Earth, 26 de abril del 2022.

De igual forma, se trabajó en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, específicamente en la Planta Piloto Agroindustrial de la Escuela de Agronegocios. Aquí se realizaron las determinaciones de laboratorio, la extracción de pectina y su caracterización. Las coordenadas para esta localización son $9^{\circ}51'15''\text{N}$ $83^{\circ}54'31''\text{O}$, asimismo para visualizar donde se ubica, se adjunta a continuación una imagen satelital.

Figura 5

Imagen satelital de Planta Piloto Agroindustrial, TEC.



Tomado de: Google Earth, 26 de abril del 2022.

Con respecto al espacio temporal, el proyecto se realizó desde noviembre del 2022 a marzo del 2023. La temporalidad del estudio se tuvo que ajustar a la disponibilidad de materia prima, la cual se puede obtener solo durante los meses de cosecha de café (J. Porras, comunicación personal, 29 de noviembre del 2022).

3.4 Sujetos de información

Los sujetos de información son todas aquellas personas que aportaron en cierta medida al desarrollo del proyecto. Los aportes realizados por los sujetos de información se basan, sobre todo, en consultas (como apoyo o recomendaciones) realizadas para el desarrollo de la metodología, en esta sección se consultaron a las siguientes personas:

- Ing Randall Chaves Abarca, docente en la Escuela de Agronegocios, con experiencia en bioquímica y ciencia de los alimentos.
- Ing Jimmy Porras Barrantes, gerente del Departamento de Investigación y Desarrollo de CoopeTarrazú R.L; quien se especializa en gestión ambiental.
- Ing Carlos Gómez Córdoba, Ingeniero agropecuario con amplia experiencia en tecnología y bioquímica de alimentos.
- Ing Roger Matamoros Valverde, Ingeniero en agronegocios.

- Ing Carolina Guadamuz Mayorga, docente en la Escuela de Agronegocios, especializada en tecnología de alimentos.

Asimismo, con respecto a datos específicos de CoopeTarrazú R.L. el Ing Jimmy Porras Barrantes proporcionó todos los datos relacionados a la empresa.

3.5 Fuentes de información

Para el desarrollo de los objetivos del trabajo, se necesitó una base de información que permitiera establecer las diferentes metodologías que se realizaron. Para ello, se consultaron tanto fuentes primarias como secundarias. Las fuentes de información primaria son aquellas que aportan conocimiento nuevo y que no han sido sometidas a tratamientos posteriores; como lo son las monografías, libros, publicaciones y literatura gris (Cabrera, 2010). Fueron de suma importancia en el planteamiento y desarrollo de este Trabajo Final de Graduación, ya que de ellas se extrajeron toda la información para justificar el problema de investigación. Además, se utilizaron para determinar la metodología realizada. La gran mayoría de las fuentes se obtuvieron a través de Scopus y el ICAFE.

Por otro lado, las fuentes secundarias también se tomaron en cuenta en ciertos casos durante el desarrollo de esta investigación. Estas fuentes son caracterizadas por presentar el resultado de análisis documentales, o sea, que ya se ha trabajado sobre el contenido de estas, tomando como base las fuentes primarias; generando resúmenes, citas, conclusiones, etc (Cabrera, 2010). Para este proyecto, las fuentes secundarias se basaron en publicaciones encontradas a través de Scopus, o bien documentos oficiales de organismos como el ICAFE, FAO o CoopeTarrazú.

3.6 Variables o atributos de la investigación

En la Tabla 6, se desglosan las variables o atributos de la investigación necesarios para la ejecución de este proyecto.

Tabla 6

Variables o atributos de la investigación.

Objetivo específico	Variable/Atributo	Análisis de datos	Indicador/Unidad
Caracterizar el mucílago contenido en las aguas mieles por medio de pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, que permitan la determinación de la presencia de pectina.	<p>Análisis fisicoquímico:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. pH 2. Concentración se sólidos solubles 3. Densidad <p>Análisis microbiológico:</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. Recuentos coliformes totales 5. Recuento <i>Escherichia coli</i> 6. Recuento de hongos filamentosos 7. Recuento levaduras 8. Recuento mesófilo aerobio 9. Recuento de enterobacterias 	<p>Los métodos para cada análisis fueron:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. pH (pH-métro de mesa) 2. Refractómetro 3. Densidad indirecta 4. PT-MIC-27 5. PT-MIC-27 6. PT-MIC-35 7. PT-MIC-35 8. PT-MIC-34 9. PT-MIC-27 <p>Con respecto al análisis estadístico, para los valores de la caracterización fisicoquímica, estos fueron analizados con estadística descriptiva, y una prueba de Anderson-Darling para determinar normalidad. Por otro</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. pH 2. °Brix 3. g/mL <p>Análisis microbiológico: UFC/mL</p>

lado, se determinó el intervalo de confianza (95%) y el promedio para reportarlos. Por último, se realizó un ANOVA y prueba de Tukey; esta última para determinar diferencias significativas.

Para el análisis microbiológico, este no se trató debido a que son resultados de laboratorio externo.

Realizar la extracción de pectinas contenidas en el mucílago de café, a lo largo de la temporada de cosecha, mediante hidrólisis ácida.	Rendimiento extracción de pectina	La extracción de pectina se realizó por medio de hidrólisis ácida, utilizando ácido cítrico como catalizador.	G de pectina/1L de aguamiel
		Con respecto al análisis estadístico, para los valores de rendimiento de extracción de pectina, estos fueron analizados con	

estadística descriptiva, y una prueba de Anderson-Darling para determinar normalidad. Por otro lado, se determinó el intervalo de confianza (95%) y el promedio para reportarlos. Por último, se realizó un ANOVA y prueba de Tukey; esta última para determinar diferencias significativas.

<p>Comprobar la funcionalidad, como aditivo alimentario, que posee la pectina extraída de las aguas mieles del beneficiado del café, mediante su aplicación en un producto alimentario.</p>	<p>Viscosidad de muestra Se utilizó un viscosímetro para medir la viscosidad. Centipoise (cP)</p> <p>Con respecto al análisis estadístico, los valores fueron analizados con estadística descriptiva, y una prueba de Anderson-Darling para determinar normalidad. Por otro lado, se determinó el</p>
---	---

intervalo de confianza (95%) y el promedio para reportarlos. Por último, se realizó un ANOVA y prueba de Tukey; esta última para determinar diferencias significativas.

3.7 Herramientas

A lo largo de la ejecución de los objetivos se necesitaron una serie de equipos, instrumentos de laboratorio y reactivos para las diferentes mediciones o extracciones. Con respecto al primer objetivo, el análisis físicoquímico abarcó la medición de pH, densidad, temperatura y °Brix; por lo que se requirieron los siguientes equipos e instrumentos de laboratorio plasmados en la Tabla 7.

Tabla 7

Equipos, instrumentos y reactivos necesarios para el análisis físicoquímico.

Análisis físicoquímico	Equipo/instrumento/reactivo
pH	pH-métro de mesa (OAKTON PH 700)
	Beakers con capacidad para 100 mL
Temperatura	Termómetro

Densidad	Probetas de 10 mL
	Balanza analítica
°Brix	Refractómetro digital (ATAGO B827168)
	Beakers con capacidad para 100 mL
Filtración de aguas mieles	Colador
	Beaker con capacidad para 1 L
	Cucharas
	Agitador de vidrio

Por otro lado, para el segundo objetivo, que comprende la extracción de pectinas por medio de hidrólisis ácida, se requirieron los equipos, instrumentos y reactivos expuestos en la Tabla 8.

Tabla 8

Equipos, instrumentos y reactivos necesarios para extracción de pectinas.

Procedimiento	Equipo/instrumento/reactivo
Filtración de aguas mieles	Colador
	Beaker con capacidad para 1 L
	Cucharas
	Agitador de vidrio
Hidrólisis ácida	Beaker con capacidad para 500 mL y 1000 mL
	Agua destilada
	Ácido cítrico anhidro ($C_6H_8O_7$) (pureza \approx 99,7%)
	Plantilla de calentamiento (Fisher Scientific Thermix Stirring Hot Plate 210T)
	Pastilla de agitación magnética
	Bureta de 50 mL

pH-métro de mesa (OAKTON pH 700)

Termómetro

Centrifugación

Centrifugadora Rotina 380R (Hettich
Zentrifugen)

Precipitación

Beakers y probetas de 500 mL

Alcohol al 95% a 4 °C

Termómetro

Agitadores de vidrio

Filtrado al vacío

Kitasato con capacidad para 1L

Embudo Buchner

Papel filtro para análisis cualitativo, 125
mm

Compresor

Liofilización

Liofilizador (Labconco Freezone 1)

	Compresor
Molienda	RETSCH GRINDOMIX GM200
Mediciones	Probetas de 100, 500 y 1000 mL
	Balanza analítica

Por último, para la ejecución del tercer objetivo, que corresponde a la caracterización de la pectina obtenida, se ejecutaron pruebas de viscosidad. Para dichas pruebas se utilizaron los instrumentos y materiales enlistados en la Tabla 9.

Tabla 9

Equipos, instrumentos y reactivos necesarios para medición de viscosidad.

Procedimiento	Equipo/instrumento/reactivo
Preparación de la muestra (mermelada)	RETSCH GRINDOMIX GM200
	Azúcar blanca
	Ácido cítrico anhidro ($C_6H_8O_7$) (pureza \approx 99,7%)
	Fresas

Balanza

Olla y espátula

Medición viscosidad

3 beakes con capacidad para 500 mL

9 beakers con capacidad para 150 mL

Balanza

Probeta

Viscosímetro BROOKFLIED DV-II+PRO

(husillo o sonda S64)

3.8 Sistematización de objetivos

Obtención y preparación de la muestra

Las muestras de aguas mieles se recolectaron del efluente de una desmucilagadora mecánica Penagos DVX-4 (Figura 6) del Beneficio Central CoopeTarrazú R.L. En dicho proceso se utilizó la cereza de café de la especie *Coffea arabica*, cultivado en esta zona desde los 800 m s. n. m hasta los 2000 m s. n. m y forman parte de la región cafetalera Los Santos. Por otro lado, predominan las variedades Caturra y Catuai.

Figura 6

Desmucilagadora Penagos DVX-4 de donde se obtienen las muestras de aguas mieles en el Beneficio Central CoopeTarrazú R.L.



Al momento de realizar la toma de las muestras, se escogió una desmucilagadora de la serie, completamente al azar, se colocó un contenedor de plástico estéril con tapa de rosca en el tubo de salida de las aguas mieles y se recolectaron aproximadamente 20 litros de estas, esto debido a que su transporte era mucho más sencillo y fue una recomendación directa de la empresa. Una vez recolectada la muestra en Tarrazú, esta se envió, por parte de la empresa, hasta la Planta Piloto Agroindustrial de la Escuela de Agronegocios, Cartago. En el momento que se recibió el contenedor, este se guardó en una cámara de frío a 4 °C hasta que las muestras fueran utilizadas para las diferentes determinaciones, esto con el fin de retrasar el desarrollo microbiológico y el deterioro de la muestra.

Ya que uno de los objetivos del proyecto fue determinar si existe una diferencia significativa en el rendimiento de extracción de pectinas del mucílago a lo largo de la cosecha, se realizaron tres tomas de muestras en toda la cosecha de café 2022-2023. La decisión de las fechas en donde se realizó cada uno de los muestreos se basó en los tiempos de cosecha para la región (inicio, pico y final de cosecha), para lo cual se utilizó la siguiente codificación de muestras: IC, PC, FC, respectivamente. Además de considerar las indicaciones de la empresa y el tiempo que tomó en realizarse las determinaciones y respectivas extracciones.

Las muestras, al ser aguas mieles, contenían dos fracciones, una sólida y otra líquida. La fracción líquida fue la de interés, en donde se encuentra el mucílago de café mayormente diluido; y la fracción sólida (de la cual no se encontró bibliografía relacionada). Esta última, por observación, se determina que corresponde a pulpa y semillas de café, además de algunas hojas y ramas pequeñas. Para separar estas dos fracciones se ejecutó un filtrado de las aguas mieles con la ayuda de un colador, cuchara y agitador de vidrio (R. Matamoros, comunicación personal, 20 de noviembre del 2022). El filtrado de las aguas mieles se utilizó para los análisis fisicoquímicos y microbiológicos, además de la extracción de pectinas.

1. Caracterizar el mucílago contenido en las aguas mieles por medio de pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, que permitan la determinación de la presencia de pectina.

Este objetivo buscó determinar diferentes propiedades para relacionarlas con la presencia de pectina en el mucílago. Una vez preparada la muestra, ya filtrada las aguas mieles y obtenido el

mucílago diluido, se procedió a realizar las siguientes mediciones fisicoquímicas: pH, °Brix y densidad indirecta. La metodología de medición se detalla a continuación:

- **pH:** Esta medición química se realizó con un pH-métro de mesa. Primeramente, se calibró el equipo siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando los buffers respectivos (pH 4, 7 y 10). Se utilizaron tres beakers con 100 mL de mucílago, para generar un triplicado, se midió el pH a cada muestra, sumergiendo el electrodo en el centro de esta. Entre una medición y otra y realizó lavado del electrodo con agua destilada.
- **Concentración de sólidos solubles:** Con ayuda de un refractómetro digital se midió los °Brix del mucílago, determinación que refleja los sólidos solubles en una disolución, sobre todo se relaciona a medición de azúcares. Utilizando una almohadilla de algodón, se agregó la muestra encima del sensor (aproximadamente de 2 a 3 gotas) y se realizó la medición.
- **Densidad indirecta:** Esta se determinó por método indirecto. Primero, con la ayuda de un termómetro se midió la temperatura de la muestra, ya que es necesaria para reportar la densidad. Seguidamente, se pesó una probeta con capacidad para 10 mL en una balanza analítica (P_1), luego en la probeta se agregaron 10 mL (V_X) y se pesó (P_2), luego utilizando la Ecuación (2) se determinó la densidad indirecta.

$$Densidad\ indirecta = \frac{P_2 - P_1}{V_X} \quad 2$$

donde:

P_1 = masa de probeta vacía

P_2 = masa de probeta + 10 mL de mucílago

V_X = volumen de mucílago (10 mL)

Otra caracterización realizada fue la microbiológica; con el fin de determinar la presencia de microorganismos, sobre todo patógenos. Esta es un insumo útil para la Cooperativa, ya que con esta se pueden tomar las decisiones de manejo y almacenamiento; sobre todo, si se considerara un uso alimenticio. Adicionalmente, Galanakis (2015) indica que uno de los primeros pasos en la recuperación de residuos es determinar la carga microbiológica; siendo un insumo vital para determinar el pretratamiento necesario que se deba aplicar en el subproducto agroindustrial.

Anudado a ello, se liga la presencia de microorganismos con la presencia y calidad de la pectina debido a los procesos metabólicos microbianos que pueden llegar a afectar las sustancias pécticas en las aguas mieles.

Para esta caracterización se utilizó el mucílago diluido, obtenido de las aguas mieles; su preparación se explicó al inicio de la sección. Entre 1 000 y 1 500 mL de muestra se introdujeron en un recipiente para toma de muestras, de plástico y estéril (Apéndice A). Una vez listo, se trasladó a las instalaciones del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC), dentro del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Se contrató a este centro de investigación para realizar las pruebas microbiológicas, ya que los ensayos realizados están acreditados por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA). En la siguiente tabla se exponen los análisis microbiológicos realizados y el procedimiento por el cual se llevaron a cabo, estos fueron ya predeterminados por el laboratorio contratado.

Tabla 10

Análisis microbiológicos y su respectivo procedimiento.

Análisis	Procedimiento
Recuento coliformes totales (UFC/mL)	PT-MIC-27
Recuento Escherichia coli (UFC/mL)	PT-MIC-27
Recuento de hongos filamentosos (UFC/mL)	PT-MIC-35
Recuento de levaduras (UFC/mL)	PT-MIC-35
Recuento mesófilo aerobio (UFC/mL)	PT-MIC-34
Recuento de enterobacterias (UFC/mL)	PT-MIC-27

2. Realizar la extracción de pectinas contenidas en el mucílago de café, a lo largo de la temporada de cosecha, mediante hidrólisis ácida.

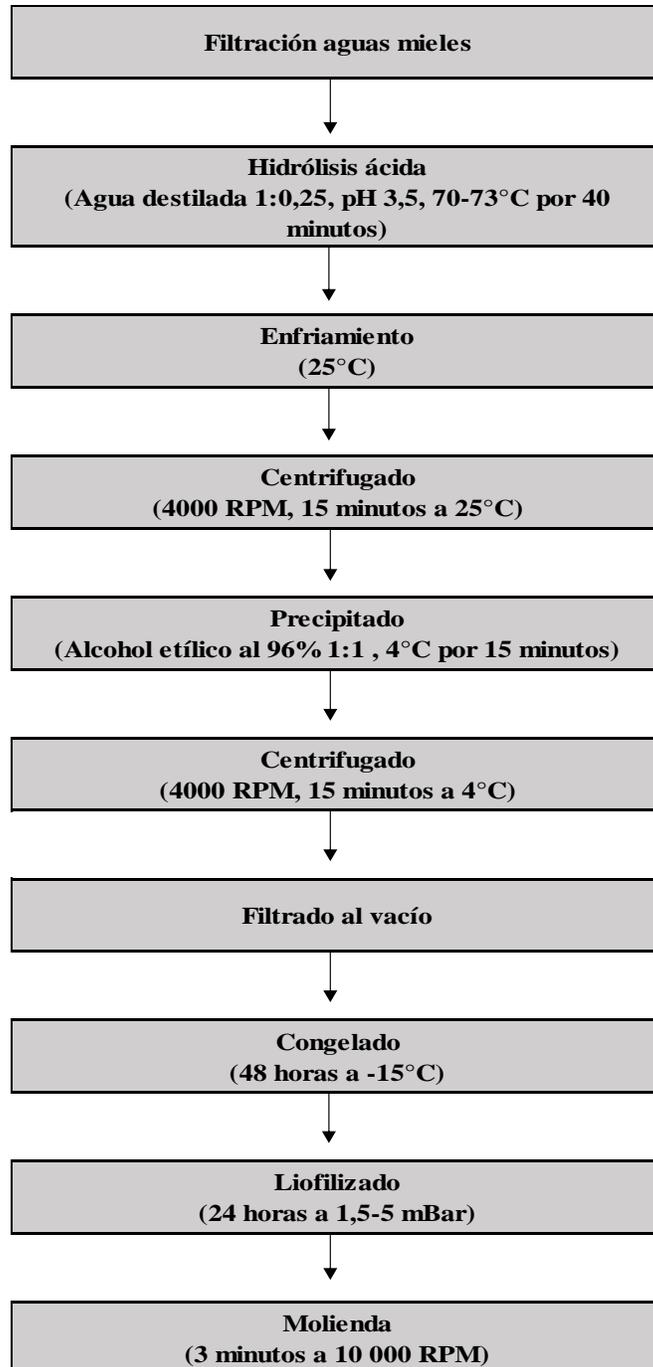
La metodología para la extracción de pectina del mucílago de café se basó en procedimientos realizados por Valespino-León, y otros (2021) y Mendoza (2016), con algunas modificaciones. Dichas modificaciones se realizaron con base en la disponibilidad de equipos, insumos y cristalería en el laboratorio. Además, también se realizaron pruebas preliminares para familiarizarse y

estudiar el proceso, para así hacer ajustes a la metodología según el criterio del investigador y lo mencionado anteriormente. Se tomaron 4 muestras en cada tiempo de cosecha. La cantidad de muestras se definió basándose en la capacidad del laboratorio en términos de cristalería y equipos, por ende, no podía ser superior a 4.

En la Figura 7 se observa el procedimiento efectuado para obtener pectinas de las aguas mieles del café. El proceso inició con la preparación de la muestra, mediante la filtración de las aguas mieles. El líquido filtrado se llevó a hidrólisis ácida (70-73 °C por 40 minutos), agregando agua destilada en una proporción 1:1 y acidificando el medio, con ácido cítrico al 70%, hasta un pH de 3,5. Luego de hidrolizar, se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que alcanzara los 25°C. Seguido, el material hidrolizado y enfriado se centrifugó y después se realizó el precipitado con alcohol etílico al 96% (4 °C), para obtener los sólidos insolubles en alcohol. Esta disolución se llevó a centrifugación, de la cual se obtuvo un precipitado gelatinoso. A este precipitado se le aplicaron dos lavados (alcohol etílico al 96%, 4°C), para aumentar la recuperación y pureza del precipitado. Se procedió con la filtración al vacío, en la cual se aplicaron dos lavados más (alcohol etílico al 96%, 4 °C) sobre el sólido retenido. El material recuperado se congeló, y luego se liofilizó, de esta forma al no aplicar calor se procura la calidad y estructura del polímero. Por último, la pectina liofilizada se molió por 3 minutos a 10 000 RPM, condiciones que se establecieron gracias a las pruebas preliminares, ya que en ellas se observó que a menos RPM se obtenía una pectina final con forma de cristales o pequeñas "escamas" que podían dificultar su solubilidad.

Figura 7

Diagrama de proceso para extracción de pectina del mucílago contenido en las aguas mieles.



3. Comprobar la funcionalidad, como aditivo alimentario, que posee la pectina extraída de las aguas mieles del beneficiado del café.

Se llevó a cabo una prueba de viscosidad para medir la resistencia que genera la pectina de mucílago de café como aditivo alimentario, principalmente con respecto a la gelificación. Dicha prueba se realizó elaborando 3 formulaciones de mermelada de fresa, todas bajo los mismos parámetros, pero variando en ellas la pectina utilizada. Se escogió la fresa, por su bajo contenido de pectina (Prera, 2000), de esta forma no se interfiere con las mediciones en la formación del gel. Por otro lado, es importante mencionar que el nombre de la pectina comercial utilizada no se expondrá.

La preparación de las muestras comprendió la molienda de las fresas con la ayuda de un RETSH GRINDOMIX GM200 por 2 minutos a 6 000 rpm, con el fin de minimizar al máximo posible el tamaño de partícula y evitar así interferencias en la medición de viscosidad. Una vez triturada la fruta, se procedió a elaborar la mermelada, las tres se llevaron a cocción, asegurando la concentración de sólidos finales en 65 °Brix, pH de 3,5 y 1% de pectina adicionada según corresponda. La pectina se agregó en conjunto con el azúcar para evitar la formación de grumos. La primera formulación se realizó utilizando pectina comercial (MPC), la segunda con pectina extraída del mucílago de café (MPM) y una mermelada control (MC) sin ningún tipo de pectina; esta última tuvo la misma preparación y parámetros finales de °Brix y pH. Las tres formulaciones se dejaron enfriar a temperatura ambiente para evitar errores en medición de viscosidad por diferencia en la temperatura de muestra.

Luego de enfriarse (19°C), las muestras se sometieron a la medición de viscosidad con ayuda de un viscosímetro BROOKFLIED DV-II+PRO, realizando un triplicado para cada una de ellas (S. Infante, comunicación personal, 27 de marzo del 2023). En un beaker se colocaron 125 mL de muestra (capacidad del equipo), luego se introdujo el husillo o sonda S64 (recomendada por el fabricante para el tipo de producto) en el centro de la muestra, asegurándose de insertar el husillo a la misma profundidad en todas las muestras con ayuda de un arco de protección con el que contaba el equipo. La configuración del equipo para realizar la medición de viscosidad fue: 60 rpm por 15 minutos (S. Infante, comunicación personal, 27 de marzo del 2023). Las evidencias de medición de este parámetro se pueden observar en el Apéndice C.

Capítulo IV. Resultados y Discusión de Resultados

4.1 Caracterización fisicoquímica

En el siguiente apartado se exponen los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados al mucílago recuperado de las aguas mieles.

4.1.1 Densidad

Los valores de densidad encontrados en esta investigación, según los tres tiempos de cosecha en los que se tomaron muestras se presentan en la Tabla 12

Tabla 11

Densidad indirecta promedio del mucílago de café según tiempo de cosecha.

Tiempo de cosecha	Densidad indirecta promedio (g/mL)
IC	(0,9858 ± 0,0034)
PC	(1,0306 ± 0,0634)
FC	(0,9910 ± 0,0130)

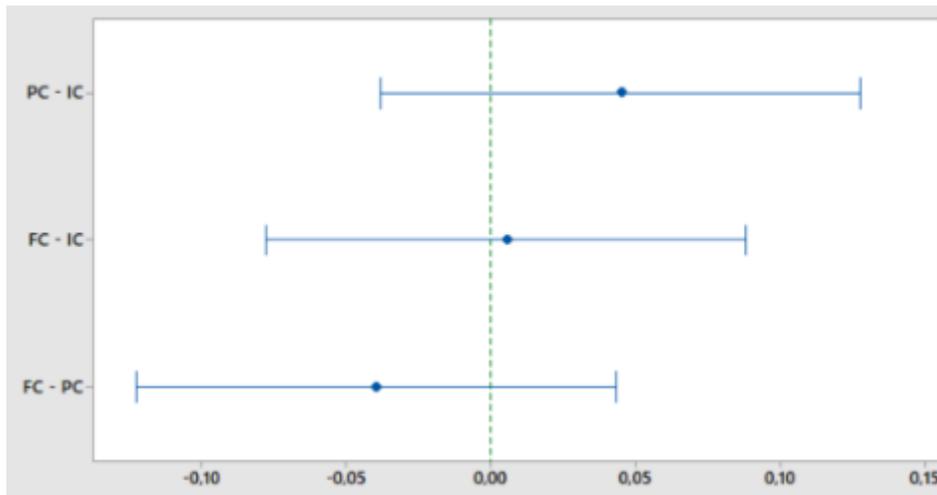
Estos valores tienen cierta similitud con los encontrados por Mendoza (2016) quien reporta que el mucílago de café posee una densidad de 1,0155 g/mL; también con lo reportado por García (2009) con valores de densidad entre 0,9451 y 0,9933 g/mL. En ambos casos se carece de información sobre el momento de recolección de las muestras, información que permitiría tener más detalle para relacionar los datos determinados en las muestras de Coopetarrazu.

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los valores de densidad según el tiempo de cosecha se llevó a cabo un análisis ANOVA y una prueba de Tukey. Utilizando un valor de confianza del 95% y un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ se obtuvo un valor de $\rho = 0,269$ ($\rho > \alpha$). Los resultados de la prueba Tukey demuestran que no existen diferencias significativas

entre los valores de densidad indirecta a lo largo del periodo de cosecha de café (Figura 8). A pesar de no encontrar diferencias significativas para la densidad en los distintos tiempos de cosecha, cabe recalcar que la densidad en PC se evidencia como ligeramente mayor. Esto se puede explicar debido a que durante el pico de cosecha normalmente se procesa una cantidad mayor de cerezas de café (P. Cascante, comunicación personal, 13 de marzo del 2023). El efecto de una mayor cantidad de cerezas contenidas temporalmente en los silos incrementa la posible ruptura de la pulpa y transferencia de mucílago durante el despulpado, generando aguas mieles con una carga mayor de sólidos. Además, por el mismo proceso fisiológico de la maduración es previsible la mayor concentración de azúcares y es conocido el incremento de la densidad con la mayor presencia de sólidos solubles y viceversa.

Figura 8

Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para la densidad del mucílago de café según tiempo de cosecha.



4.1.2 Concentración de sólidos solubles

La concentración de sólidos solubles se determinó por medio de la medición de los °Brix. Para las muestras analizadas se obtuvieron los valores de la Tabla 13.

Tabla 12

°Brix promedio del mucílago de café según tiempo de cosecha.

Tiempo de cosecha	°Brix
IC	(4,8 ± 0,3)
PC	(5,4 ± 0,2)
FC	(5,0 ± 0,1)

Al analizar la varianza de los datos utilizando un 95% de confianza, se obtuvo un $\rho = 0,038$. Por otro lado, se realizó la prueba Tukey. De ella se confirma que existe una diferencia significativa entre los valores de °Brix de PC e IC. Pero también indica que no existe diferencia significativa entre la concentración de azúcares de IC y FC. Para justificar dicha afirmación, se adjunta en la Figura 9 el gráfico sobre comparaciones de intervalos de confianza de Tukey y en la Tabla 14 la comparación en pareja de Tukey.

Figura 9

Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para los °Brix del mucílago de café según tiempo de cosecha.

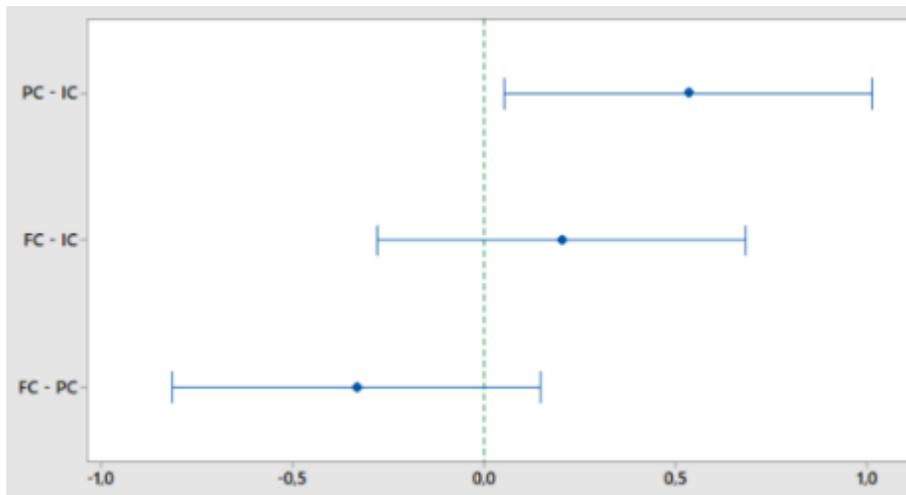


Tabla 13

Resultado comparación en parejas de prueba Tukey para °Brix del mucílago de café según tiempo de cosecha.

Factor	N	Media	Agrupación	
PC	3	5,4	A*	
FC	3	5,0	A*	B*
IC	3	4,8	B*	

Nota: Tomado de análisis estadístico realizado con MiniTab.

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Los tres tiempos de cosecha mostraron valores por debajo del reportado por Guerra y Rueda (2021) de 7,2 °Brix; sin embargo, estos autores no hacen referencia al momento durante la cosecha en el cual se hizo la toma de la muestra; lo cual dificulta la comparación de los resultados con la teoría, especialmente porque se determinó que si existen cambios en el contenido de sólidos solubles (Tabla 14) del mucílago contenido en las aguas mieles a lo largo de la temporada de cosecha. También se pueden generar cambios en esta determinación por el volumen de agua utilizado durante el procesamiento del café y por la cantidad de frutos de café que se procesaron; ya que, al trabajar con una cantidad mayor, se puede esperar un aumento en los azúcares disueltos en las aguas mieles.

La diferencia significativa entre PC e IC se justifica debido al proceso de maduración del fruto de café y la dinámica de recolección que se da en cafetales. Típicamente en el inicio de cosecha, la cantidad de frutos maduros es menor que durante el pico de cosecha. Al igual que otros frutos, la cereza de café al entrar en madurez, convierte sus azúcares más complejos en azúcares más simples, los cuales tienen mayor solubilidad en agua. Este proceso se lleva a cabo por medio de acciones enzimáticas propias del proceso natural de maduración que incluye transformaciones de la molécula de pectina. Con respecto a este polímero, existen una variedad de glicosidasas que se encargan de eliminar azúcares como la galactosa, ramnosa y arabinosa de la cadena principal del polisacárido, por ende, estas quedan suspendidas en el medio y aumentan la concentración de

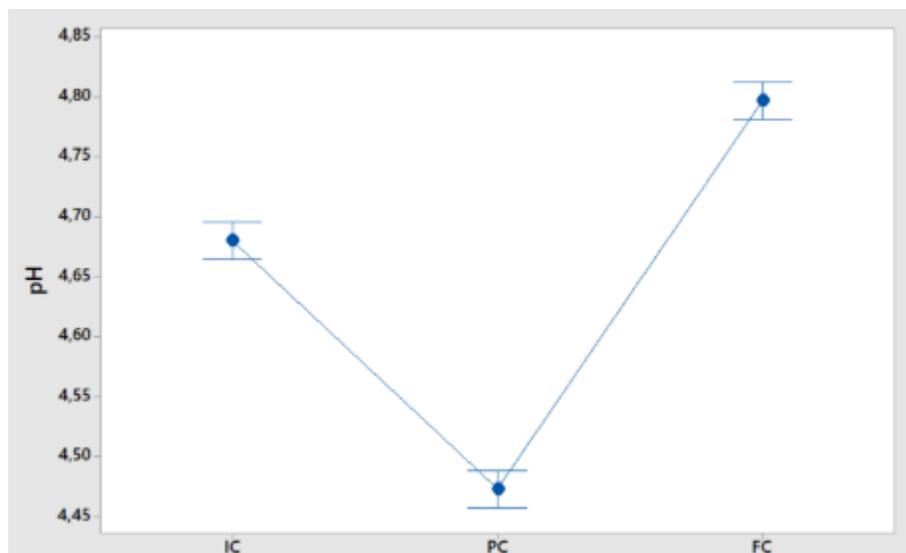
sólidos solubles (Pagán, 1996). Por otro lado, que no exista diferencia significativa entre los °Brix de IC y FC radica también en el comportamiento de la recolección de los frutos en esos determinados momentos de la cosecha. El inicio de cosecha y final de cosecha se caracterizan por ser similares con respecto a la distribución del tipo y estado del café recolectado; comúnmente se les conoce como granea (inicio de cosecha) y repela (final de cosecha). Para ambos casos, los frutos presentes en estas épocas no poseen tanta uniformidad en madurez como en el pico de cosecha y por ende se encuentran frutos que no poseen la madurez óptima (P. Cascante, comunicación personal, 13 de marzo del 2023).

4.1.3 pH

En la Figura 10 se expone un gráfico con los datos obtenidos de pH del mucílago de café, según el tiempo de cosecha en el que se recolectó la muestra. Para el IC se obtuvo un valor de pH promedio de $(4,68 \pm 0,01)$, para el PC de $(4,47 \pm 0,02)$ y para el FC de $(4,80 \pm 0,01)$. Estos valores son cercanos al determinado por Guerra y Rueda (2021) de 4,5; sin embargo, como en los casos anteriores, no se reporta en qué momento de la cosecha se recolectó la muestra.

Figura 10

Valores de pH del mucílago de café según tiempo de cosecha.



Al igual que las demás pruebas fisicoquímicas realizadas, se determinó si existe una diferencia significativa en el valor de pH a lo largo de la cosecha de café. Luego de realizar un ANOVA y una prueba de Tukey, se determina que si existe una diferencia significativa entre las 3 muestras de pH; lo que quiere decir que se respalda estadísticamente que el pH del mucílago de café tiene variaciones a lo largo de la temporada de cosecha. Esta afirmación se respalda con el gráfico en la Figura 11; además, en la Tabla 15 se demuestran los resultados obtenidos de la comparación de parejas de Tukey.

Figura 11

Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para el pH del mucílago de café según tiempo de cosecha.

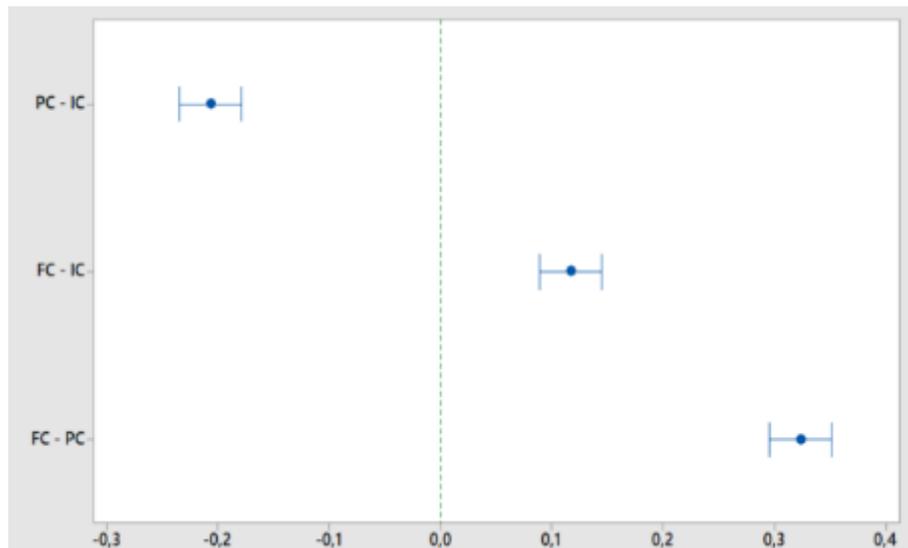


Tabla 14

Resultado comparación en parejas de prueba Tukey para pH del mucílago de café según tiempo de cosecha.

Factor	N	Media	Agrupación
FC	3	4,79667	A*
IC	3	4,68000	B*
PC	3	4,47333	C*

Nota: Tomado de análisis estadístico realizado con MiniTab.

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

El cambio de pH en el mucílago recuperado de las aguas mieles de café se podría llegar a explicar por varias razones. Una de ellas es la desintegración de la pectina a moléculas más simples que acidifican el medio, debido al proceso de maduración y la otra posible explicación es por la acción microbiológica (Tabla 16, 17 y 18) (R. Calderón, comunicación personal, 13 de enero del 2023). Esta última se detalla más en la siguiente sección de análisis microbiológico.

La pectina en los tejidos vegetales es la responsable de otorgar rigidez y estructura. La maduración natural de los frutos conlleva un ablandamiento y pérdida de cohesión de sus tejidos; esto se debe a un proceso de desintegración de la pectina. Conforme el fruto aumenta su madurez, hay un incremento en el contenido de pectina soluble en agua. Este fenómeno de solubilización de la pectina se debe a la acción de las enzimas pectinasas y otras que puedan tener efecto sobre algún grupo funcional o unión presente en este polímero. Una de ellas es la exopoligalacturonasa, perteneciente a las poligalacturonosas; cuya función es separar los residuos de ácido galacturónico, lo que podría aumentar la acidez del medio; y precisamente la presencia de esta enzima aumenta con la maduración del fruto (Pagán, 1996). Otra molécula que por naturaleza puede llegar a acidificar el medio es el ácido péctico, en este caso la pectato liasa (poligalacturonato liasa) cataliza la ruptura de los enlaces entre los ácidos pécticos, por medio de una endo o exo trans-eliminación. Sin duda alguna son numerosas las enzimas que actúan en la catalización de mecanismos relacionados a la desintegración de las sustancias pécticas (Uenojo & Pastore, 2007).

4.2 Análisis microbiológico

A continuación, se muestran los resultados de los análisis microbiológicos, según los 3 diferentes tiempos de cosecha en los que se recolectó muestra (IC, PC y FC)

Tabla 15

Resultados análisis microbiológico mucílago de café IC.

Análisis	Resultado
Recuento coliformes totales (UFC/mL)	$5,0 \times 10^4$
Recuento <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	$4,9 \times 10^3$
Recuento de hongos filamentosos (UFC/mL)	$1,0 \times 10^5$
Recuento de levaduras (UFC/mL)	$1,2 \times 10^7$
Recuento mesófilo aerobio (UFC/mL)	$4,0 \times 10^7$
Recuento de enterobacterias (UFC/mL)	$2,0 \times 10^5$

Tabla 16

Resultados análisis microbiológico mucílago de café PC.

Análisis	Resultado
Recuento coliformes totales (UFC/mL)	$4,1 \times 10^4$
Recuento <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	$3,0 \times 10^3$
Recuento de hongos filamentosos y levaduras (UFC/mL)	$5,1 \times 10^6$
Recuento mesófilo aerobio (UFC/mL)	$1,8 \times 10^7$
Recuento de enterobacterias (UFC/mL)	$1,6 \times 10^5$

Tabla 17

Resultados análisis microbiológico mucílago de café FC.

Análisis	Resultado
Recuento coliformes totales (UFC/mL)	$2,0 \times 10^6$
Recuento <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	$1,0 \times 10^3$
Recuento de hongos filamentosos (UFC/mL)	$1,0 \times 10^5$
Recuento de levaduras (UFC/mL)	$4,1 \times 10^6$
Recuento mesófilo aerobio (UFC/mL)	$2,3 \times 10^7$
Recuento de enterobacterias (UFC/mL)	$3,9 \times 10^6$

La realización del análisis microbiológico se basó en la recomendación dada por García (2009), ya que después de realizar una de las primeras indagaciones existentes en la extracción de pectina del mucílago contenido en las aguas mieles de café, recomienda realizar análisis microbiológicos para poder caracterizar completamente la materia prima. Además, la recomendación se basa en el poder tener insumos para explicar fenómenos relacionados al comportamiento de las aguas mieles y la extracción de pectina. Asimismo, al comienzo de este proyecto existía una inquietud con respecto la inocuidad de la materia prima, ya que se trata de aguas residuales de un proceso agroindustrial. Esto relacionado con el hecho que uno de los posibles usos para el producto final es en la industria alimentaria.

Los tres análisis microbiológicos expuestos anteriormente en la Tabla 16, 17 y 18, que se realizaron durante IC, PC y FC demuestran una variada presencia de microorganismos. Para las 3 muestras se reporta la presencia de las bacterias patógenas *E. coli*, enterobacterias y coliformes, siendo la *E. coli* la única que se mantuvo constante a lo largo de la temporada de cosecha con un exponencial de 10^3 . Además, es el parámetro microbiológico con menor carga bacteriana (UFC). Por otro lado, todas las muestras mostraron la presencia de hongos filamentosos, levaduras y mesófilos aerobios, que, a pesar de ser patógenos, si son parámetros que permiten justificar la degradación (por acción microbiológica) de las pectinas y otros compuestos presentes en las aguas mieles que puedan ser degradados por acción microbiana o enzimática (enzimas producidas por metabolismo microbiológico). Por otro lado, las levaduras y hongos filamentosos se caracterizan por ser microorganismos que crecen en condiciones ácidas; por lo que su presencia no es inusual en subproductos como las aguas mieles. Según el análisis fisicoquímico realizado en el primer objetivo, el pH de las aguas mieles se encuentra entre 4,68 y 4,80; rangos ácidos que son el ambiente óptimo para el desarrollo de hongos y levaduras. Dicha premisa también es respaldada por Guerra y Rueda (2021) quienes detectaron la presencia de estos microorganismos en las muestras de aguas mieles y un pH que tiende a ácido.

La desintegración de la pectina se ve afectada por la acción enzimática y microbiológica. Al tratarse de un microorganismo, dicha desintegración se da por enzimas que libere al medio o bien por procesos metabólicos consuma los carbohidratos presentes en las aguas mieles. Algunas de las bacterias que producen enzimas pécticas son: *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae*, *Bacillus sp*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium felsineum*, *Erwinia aroidae*, *Fusarium solani*, *Penicillium expansum* y *Rhizoctonia solani* (Uenojo & Pastore, 2007). Basado en los criterios anteriormente descritos, es relevante que en próximas indagaciones sobre extracción de pectina se pueda determinar pretratamientos que ayuden a disminuir la carga bacteria y puedan retardar la desintegración de las sustancias pécticas, o bien, el compuesto de interés que se desee recuperar.

Otro punto importante es el hecho que no existe ninguna legislación que determine los parámetros microbiológicos para la recuperación de residuos. Por ello, para el caso de las aguas mieles, no existe algún estudio o reglamentación que se pueda utilizar para determinar si este material en específico es seguro desde un punto de vista microbiológico. Sin embargo, se puede realizar una

comparación, muy general, basándose en el RTC: Alimentos, criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. En este se indican los límites máximos microbiológicos permitidos en Centroamérica para alimentos, siendo específico para cada alimento según su procesamiento y naturaleza. En dicha norma, para bacterias patógenas se permite, en algunos alimentos, un límite máximo en *E. coli.* y enterobacterias de 10 UFC/g y coliformes totales < 1,1 NMP/100 mL. Al comparar estos límites máximos con los resultados obtenidos (Tabla 16, 17 y 18) se concluye que las aguas mieles poseen cargas microbiológicas peligrosas en términos de inocuidad. Esto sugiere inmediatamente la necesidad de realizar pretratamientos cuando se quiera utilizar las aguas mieles como materia prima para la recuperación de compuestos. Basado en ello y en el fin como aditivo alimentario, en este proyecto, existe una etapa unitaria que por sus condiciones logran reducir la carga bacteriana. Esta es la hidrólisis ácida, ya que por criterios técnicos al acidificar el medio a un pH de 3,5 y aplicar calor (70-73 °C) por 40 minutos se logra disminuir la carga microbiológica a rangos aceptables. Sin embargo, de igual manera es importante realizar un análisis microbiológico al producto final para asegurar dicha afirmación.

4.3 Extracción de pectina

Los rendimientos de extracción de pectina se plasman en la Tabla 19. En esta se puede observar que el mayor rendimiento de extracción se obtuvo a inicios de cosecha; y que el menor se obtuvo durante el pico de cosecha. Sin embargo, entre IC y FC, los rendimientos son muy cercanos.

Tabla 18

Rendimientos de extracción de pectina.

Tiempo de cosecha	g pectina/1 L de agua miel
IC	(5,2781 ± 0,3891)
PC	(3,7775 ± 0,1868)
FC	(5,0703 ± 1,9639)

A pesar de mostrar diferentes rendimientos de extracción a lo largo de la temporada de cosecha, según el análisis Tukey (95% de confianza) no existen diferencias significativas entre los

rendimientos obtenidos. En el análisis de la varianza se obtuvo un $\rho = 0,207$. En el gráfico con los resultados de la prueba Tukey (Figura 12) se demuestra que los tres intervalos de confianza coinciden. Por otro lado, en la Tabla 20 se observa la comparación en parejas de Tukey, donde se comprueba que las medias no son significativamente diferentes. Mendoza (2016) realizó una extracción de pectina utilizando ácido cítrico como agente acidificante y obtuvo un rendimiento de 9,24 g de pectina/1L de agua miel; rendimiento que supera a los obtenidos en este estudio. Por otro lado, el menor rendimiento, que se obtuvo fue en PC, se puede explicar por medio de los análisis fisicoquímicos realizados. En estos se observa como durante el pico de cosecha hay un menor pH y una mayor cantidad de solidos solubles, lo cual indica una mayor degradación de la pectina; debido a los procesos microbiológicos y enzimáticos. Esto se vio reflejado precisamente en el rendimiento de extracción y por ende en el pico de cosecha, al obtener una mayor cantidad de frutos con un punto de madurez con más uniformidad, la presencia de pectina es menor. Bajo la misma premisa se explica porque se obtuvieron rendimientos de extracción mayores durante IC y FC.

Figura 12

Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para el rendimiento de extracción.

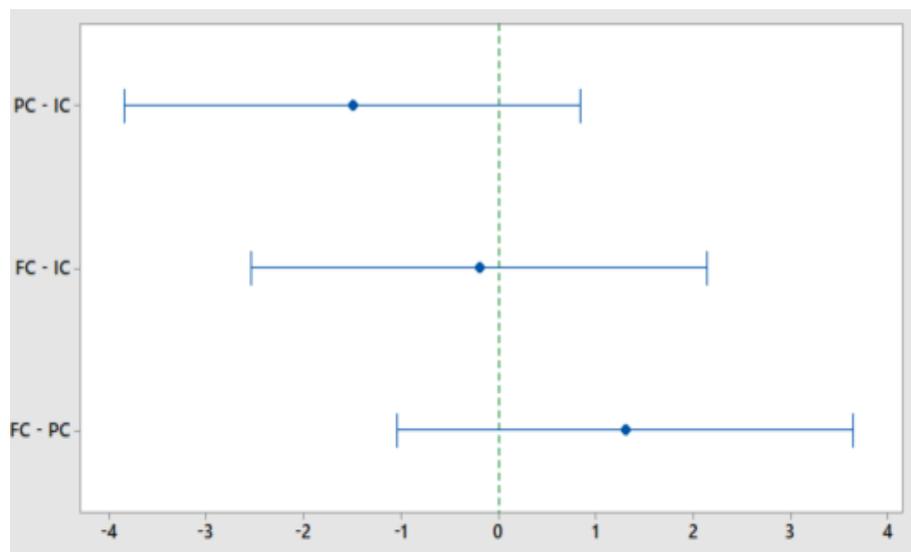


Tabla 19

Resultado comparación en parejas de prueba Tukey para el rendimiento de extracción.

Factor	N	Media	Agrupación
IC	4	5,278	A*
FC	4	5,070	A*
PC	4	3,777	A*

Nota: Tomado de análisis estadístico realizado con MiniTab.

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A pesar de que la metodología utilizada logró la extracción de las sustancias pécticas exitosamente, es necesario seguir con la investigación para obtener el procedimiento óptimo para la recuperación de este biopolímero; basándose en tecnologías de química sostenible donde se minimice la generación de residuos y la utilización de insumos contaminantes. Dentro de las posibles mejoras que se deben tomar en cuenta, sin duda alguna se debe crear un procedimiento para la recuperación de las aguas mieles, tomando como insumo los análisis ejecutados en este proyecto y la discusión ejecutada de los mismos. Dentro de un posible procedimiento para la utilización de las aguas mieles como insumo para la obtención de biocompuestos, se debe tomar en cuenta la alta carga microbiológica y la acción enzimática, que son factores que afectan las moléculas que se quisieran extraer. Por otro lado, en términos de escalar la extracción de pectina es necesario poder adaptar la línea de procesamiento del café para un tratamiento inmediato de este subproducto, debido a su rápido deterioro. Asimismo, se deben tomar en cuenta los insumos, sobre todo el alcohol, ya que se pudo identificar que este es el insumo más utilizado en el proceso de extracción de pectinas y en este caso resulto ser una limitante.

4.4 Viscosidad

La finalidad de realizar mediciones de viscosidad en mermeladas utilizando pectina comercial (MPC) y la pectina de mucílago de café (MPM) es poder comprobar la funcionalidad que posee para formar geles, esto aplicado en un producto. Los resultados de medición de viscosidad se exponen en la Tabla 21.

Tabla 20

Resultados de viscosidad promedio.

Código de muestra	Viscosidad (cP)
MPC	(65,2 ± 2,0)
MPM	(32,3 ± 2,9)
MC	(23,0 ± 2,5)

Analizando los datos con una prueba de Tukey, se determinó que existe diferencias significativas entre las tres formulaciones realizadas. Lo cual sugiere que a pesar de que la pectina de mucílago no generó una viscosidad similar a la de MPC, sí generó una viscosidad mayor a la mermelada control y significativamente diferente. Esto quiere decir que en efecto la pectina de mucílago de café generó un hidrogel que aportó cierta viscosidad al producto. En la Figura 13 se observa el gráfico de comparaciones simultáneas, donde se observa que ninguno de los intervalos de confianza comparte un rango y ninguno se encuentra dentro de cero. Asimismo, en la Tabla 22 se observan los resultados de la comparación de pares de Tukey.

Figura 13

Gráfico de comparaciones simultáneas de intervalos de confianza de Tukey para la viscosidad según formulaciones

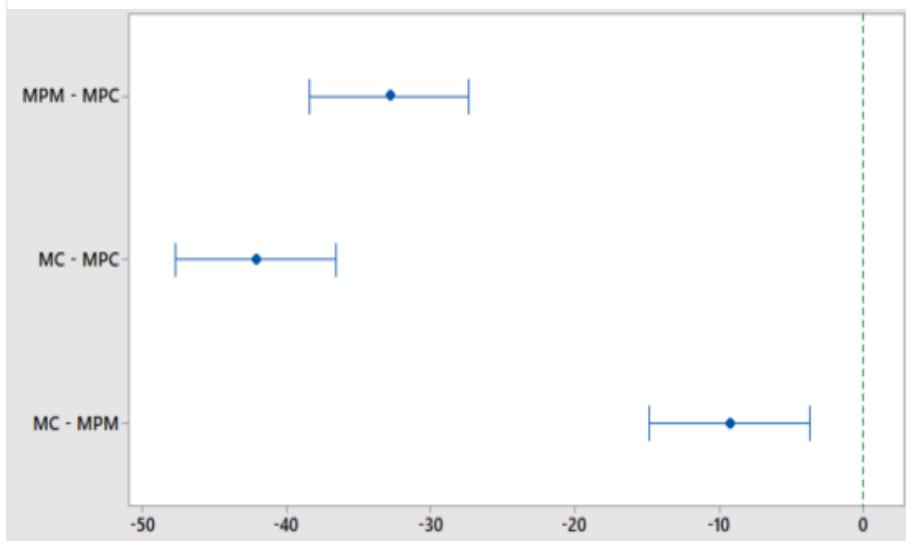


Tabla 21

Resultado comparación en parejas de prueba Tukey para la viscosidad según formulaciones.

Factor	N	Media	Agrupación
MPC	3	65,17	A*
MPM	3	32,30	B*
MC	3	23,03	C*

Nota: Tomado de análisis estadístico realizado con MiniTab.

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Como se mencionó anteriormente, con base en el análisis estadístico se puede confirmar que la pectina extraída genera geles al ser utilizada como aditivo alimentario; sin embargo, la viscosidad que aporta en un producto no es igual estadísticamente a la de una pectina comercial. Por otro lado, es importante mencionar que la pectina de mucílago de café utilizada es un prototipo, lo que quiere

decir que aún carece de procedimientos de purificación y estandarización. Las pectinas comerciales son formulaciones ya estandarizadas, muchas veces previamente mezcladas con sacarosa y otros aditivos que impulsan las propiedades gelificantes que posee este polímero (García, 2009). Por ello, se debe seguir incursionando en la mejora de este extracto para que se pueda potenciar sus habilidades como biopolímero.

Por último, con la metodología aplicada en este proyecto se logró extraer sustancias pécticas presentes en el mucílago de café contenido en las aguas mieles. Esto sugiere que la recuperación del biopolímero resulta como una opción viable, desde el laboratorio, para la valorización de este subproducto en CoopeTarrazú R.L. De esta forma, se impulsa las iniciativas que posee la cooperativa en transformar sus procesos de una economía lineal a una más circular. Sin embargo, aún se debe mejorar el procedimiento de extracción y de formulación del producto final para obtener un producto de calidad. A esto se suma el hecho de que no existe una legislación vigente que norme desde un punto microbiológico, de calidad, e incluso legal la utilización de las aguas mieles como materia prima para la recuperación de biocompuestos.

Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Luego de realizar la caracterización del mucílago de café se determinó las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas que logran explicar el comportamiento de la pectina. En este análisis se pudo denotar diferencias significativas en los valores de °Brix, que junto al pH se ven afectados por la acción enzimática y microbiológica, y se relacionan a la presencia y calidad del polímero en estudio. Asimismo, se encontró la presencia de microorganismos que aceleran el deterioro de las aguas mieles y bacterias que amenazan contra la inocuidad alimentaria.

Se logró extraer exitosamente pectinas del mucílago contenido en las aguas mieles del café; como alternativa a la recuperación de residuos en CoopeTarrazú R.L. La extracción se realizó por medio de una hidrólisis ácida, acidificando el medio con ácido cítrico y liofilizando la pectina para asegurar su calidad; siendo el mayor rendimiento de extracción de 5,2781 g de pectina/1L de agua miel proveniente de IC. Asimismo, estadísticamente no existen diferencias significativas entre la extracción de pectinas en diferentes tiempos a lo largo de la temporada de cosecha.

En cuanto a la caracterización de la pectina obtenida, las pruebas de viscosidad mostraron que es capaz de formar un gel que sí aporta viscosidad a un producto alimenticio. Aunque, no genera una viscosidad similar estadísticamente, bajo las mismas condiciones, a la pectina comercial. No obstante, esta última cuenta con una estandarización previa, que le permite tener una purificación e incluso la adición de otros componentes que puedan asegurar la formación del gel.

5.2 Recomendaciones

Con respecto al proceso de extracción de pectina, se recomienda a CoopeTarrazú R.L seguir investigando y mejorando el proceso; realizando variaciones especialmente en la preparación de la muestra ya que podrían aumentar los rendimientos.

Asimismo, se recuerda tener suma atención al proceso de hidrólisis ácida, ya que es una etapa crucial y la variación en sus condiciones afecta directamente la cantidad y calidad de pectina extraída. Siguiendo la línea de recomendaciones del proceso, también se aconseja a la empresa considerar la destilación del alcohol contenido en los residuos de las etapas de precipitación y lavados, con el fin de reutilizarlo durante este mismo proceso. Además, el alcohol es el insumo más utilizado en el proceso, por lo que podría incluso llegar a ser una limitante del proceso si no se cuenta con la cantidad necesaria.

También se recomienda evaluar tratamientos en las aguas mieles que faciliten su recuperación y la de biocompuestos. Al mismo tiempo, si se desea escalar la extracción de pectina, es importante que se generen procedimientos para disminuir la desintegración de la pectina por acción enzimática y microbiológica. Algunos de los métodos que se puedan utilizar son la pasteurización aplicando calor, o pasteurización aplicando altas presiones hidrostáticas (para disminuir la temperatura utilizada); o incluso métodos alternativos como la utilización de rayos ultravioleta. Además, se puede considerar la evaluación estadística del comportamiento y extracción de la pectina extraída con respecto a valores fisicoquímicos por medio de una correlación. Sin embargo, es importante aumentar el número de muestra para disminuir el error y validez de los datos.

Por último, en general, seguir indagando en las posibilidades de recuperación de residuos dentro de CoopeTarrazú R.L; utilizando como base los insumos aportados en esta investigación. Se recomienda aprovechar los azúcares fermentables que existen en las aguas mieles, donde se puede optar por una concentración de la muestra para disminuir el volumen de la misma y aumentar los °Brix. De igual forma, seguir investigando las aplicaciones que posee la pectina de mucílago de café, no solo en la industria alimentaria. Para terminar, se recomienda que, al momento de seguir investigando en diferentes alternativas para aprovechar los subproductos, tomar en cuenta métodos de química sostenible. Esto ya que es una tendencia dejar atrás el uso de solventes altamente contaminantes y peligrosos para la salud, y migrar al uso de tecnologías más “limpias”.

Capítulo VI. Bibliografía

- Alfaro, V. (2015). *EFFECTOS DE LA ALTITUD SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y ORGANOLÉPTICAS DEL CAFÉ DE LA ZONA DE LOS SANTOS*. Obtenido de <https://www.ingbiosistemas.ucr.ac.cr/wp-content/uploads/2016/02/tesis-veronica-alfaro.pdf>
- Avallone, S., Guiraud, J., Guyot, B., Olguin, E., & Brillouet, J. (2000). *Polysaccharide constituents of coffee-bean Mucilage*. *Journal of food science*, 65(8), 1308-1311. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10602.x>
- Bourne, M. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement*. . Elsevier.
- Cabrera, M. (2010). *Introducción a las fuentes de información*. Universidad Politécnica de Valencia. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/7580/introduccion%20a%20las%20fuentes%20de%20informaci%c3%83%c2%b3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carvalho, C., Carvalho, S., & Souza, B. (2019). *Coffe. Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems*. Springer, Cham., 277-291. doi:https://doi-org.ezproxy.itcr.ac.cr/10.1007/978-3-030-24733-1_23
- Casas-Orozco, D., Villa, A., Bustamante, F., & González, L. (2015). *Process development and simulation of pectin extraction from orange peels*. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 86-98. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.06.006>
- Chaparro, S., Márquez, R., Sánchez, J., Vargas, M., & Gil, J. (2015). *Extracción de pectina del fruto del higo (Opuntia ficus indica) y su aplicación en un dulce de piña*. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(2), 435-443. Obtenido de <https://doi.org/10.31910/rudca.v18.n2.2015.171>
- Chemat, F., & Vian, M. (2014). *Alternative solvents for natural products extraction*. Springer Berlin Heidelberg.
- CoopeTarrazú. (2022). *SOBRE COOPETARRAZÚ*. Obtenido de <https://www.coopetarrazu.com/sobre-coopetarrazu-la-cooperativa-de-tarrazu/>
- DaMatta, F., Avila, R., Cardoso, A., Martins, S., & Ramalho, J. (2018). *Physiological and Agronomic Performance of the Coffee Crop in the Context of Climate Change and Global*

- Warming: A Review. *Agricultural and Food Chemistry*, 66, 5264-5274. doi:<https://doi.org/ezproxy.itcr.ac.cr/10.1021/acs.jafc.7b04537>
- de Moura, F., Macagnan, F., de Oliveira Petkowicz, C., & da Silva, L. (2020). *Partially hydrolyzed pectin extracted from passion fruit peel: Molar mass and physicochemical properties. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 21, 100206. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100206>
- de Oliveira, C., Giordani, D., Lutckemier, R., Gurak, P., Cladera-Olivera, F., & Marczak, L. (2016). *Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. LWT-Food Science and Technology*, 71, 110-115. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.027>
- Dias, M., Melo, M., Schwan, R., & Silvia, C. (2015). *A new alternative use for coffee pulp from semi-dry process to β -glucosidase production by Bacillus subtilis. Letters in applied microbiology*, 61(6), 588-595. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/lam.12498>
- Dranca, F., & Oroian, M. (2018). *Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. Food Research International*, 113, 327-350. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.065>
- Fishman, M., Chau, H., Hoagland, P., & Hotchkiss, A. (2006). *Microwave-assisted extraction of lime pectin. Food Hydrocolloids*, 20(8), 1170-1177. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.01.002>
- Fuentes, N. (2019). *EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN BENEFICIOS DE CAFÉ, EN TÉRMINOS DE SUS EMISIONES DE GASES DE EFECTO INVERNADERO*. Obtenido de https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/18152/TFG_Nathaly%20Fuentes%20Jim%C3%A9nez.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Galanakis, C. (2015). *The universal recovery strategy. In Food waste recovery (pp. 59-81). Academic Press*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800351-0.00003-1>
- Galanakis, C. (2017). *Handbook of coffee processing by-products: sustainable applications. Academic Press*.
- García, J. (2009). *Evaluación del rendimiento de extracción de pectina en aguas mieles del beneficiado de café procedentes de desmucilaginado mecánico*.

- Gómez, J. (2019). *Modelación del procesamiento agroindustrial del café desde la fruta hasta el café oro*. Obtenido de <https://www.ingbiosistemas.ucr.ac.cr/wp-content/uploads/2019/10/TFG-JoseMariaGomezM.pdf>
- Guerra, M., & Rueda, D. (2021). *Producción de una biopelícula a partir de las pectinas extraídas del mucílago de café. [Trabajo de grado, Fundación Universidad de América] Repositorio Institucional Lumieres*. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.11839/8646>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación*. Obtenido de <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>
- Hosseini, S., Khodaiyan, F., Kazemi, M., & Najari, Z. (2019). *Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method. International journal of biological macromolecules, 125, 621-629*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.096>
- ICAFÉ. (2009). *TRATAMIENTO DE AGUAS DEL PROCESO DE BENEFICIADO POR ASPERSION SOBRE PASTO "ESTRELLA" (CYNODOM MNLENFLUENSIS)*. Obtenido de http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/circulares_sector/circulares_2009/2009-05-26%20%5BCircular%201554%2C%20Tratamiento%20de%20Aguas%20del%20Proceso%20de%20Beneficiado%20por%20Aspersión%20sobre%20Pasto%20_Estrella_%20%28Cynodom%20Mnlenfluensis%29%5D.pdf
- ICAFE. (2011). *Guía Técnica para el Cultivo del Café*. Obtenido de <https://www.icafe.cr/wp-content/uploads/cicafe/documentos/GUIA-TECNICA-V10.pdf>
- ICAFE. (2021). *INFORME SOBRE LA ACTIVIDAD CAFETALERA DE COSTA RICA*. Obtenido de http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/informacion_mercado/informes_actividad/actual/Informe%20Actividad%20Cafetalera.pdf
- ICAFE. (2022). *Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica*. Obtenido de <https://www.icafe.cr/sector-cafetalero/informacion-de-mercado/informes-de-la-actividad-cafetalera/>
- ICAFE. (2023). *Preguntas frecuentes – Recolección. ¿Cuándo inicia la cosecha en mi región?* Obtenido de <https://www.icafe.cr/icafe/preguntas-frecuentes/>
- ICAFE. (s. f.). *El Mejor Café del Mundo*. Obtenido de <https://www.icafe.cr/nuestro-cafe/el-mejor-cafe-del-mundo/>

- ICO. (s. f.). *International Coffee Organization. Aspectos botánicos*. Obtenido de https://www.ico.org/es/botanical_c.asp
- Jiménez-Castro, Á. (2013). *El café en Costa Rica: gran modelador del costarricense*. San José: Editorial UCR.
- Kadam, S., Tiwari, B., Álvarez, C., & O'Donnell, C. (2015). *Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides*. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60-67. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012>
- Koh, P., Leong, C., & Noranizan, M. (2014). *Microwave-assisted extraction of pectin from jackfruit rinds using different power levels*. *International Food Research Journal*, 21(5), 2091. Obtenido de [http://psasir.upm.edu.my/id/eprint/40808/1/52%20IFRJ%2021%20\(05\)%202014%20Koh%20643.pdf](http://psasir.upm.edu.my/id/eprint/40808/1/52%20IFRJ%2021%20(05)%202014%20Koh%20643.pdf)
- Lazaridou, A., & Biliaderis, C. (2020). *Edible films and coatings with pectin. Pectin: Technological and physiological properties*, 99-123. Obtenido de https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_6
- Lupi, F., Gabriele, D., Seta, L., Baldino, N., de Cindio, B., & Marino, R. (2015). *Rheological investigation of pectin-based emulsion gels for pharmaceutical and cosmetic uses*. *Rheologica Acta*, 54, 41-52. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00397-014-0809-8>
- Maran, J., & Sivakumar, V. (2013). *Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel*. *Carbohydrate polymers*, 97(2), 703-709. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.052>
- Maran, J., Priya, B., Al-Dhabi, N., Ponmurugan, K., Moorthy, I., & Sivarajasekar, N. (2017). *Ultrasound assisted citric acid mediated pectin extraction from industrial waste of Musa balbisiana*. *Ultrasonics sonochemistry*, 35, 204-209. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.09.019>
- Marić, M., Grassino, A., Zhu, Z., Barba, F., Brnčić, M., & Brnčić, S. (2018). *An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction*. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 28-37. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.022>

- Márquez, L., & Ledesma, B. (2020). *Valorización de residuos de aguamiel del café para la obtención de polisacáridos*. Obtenido de <https://repositorio.ucm.edu.co/handle/10839/2799>
- Márquez, L., & Ledesma, B. (2020). Valorización de residuos de aguamiel del café para la obtención de polisacáridos.
- Masuelli, M., & Blumenberg, M. (2020). *Pectins: extraction, purification, characterization and applications*. *BoD—Books on Demand*. Obtenido de https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=QKf8DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=Pectins:+Extraction,+Purification,+Characterization+and+Applications&ots=x_MQ6evWAB&sig=hOhwzSAknSbWvo0mQ59IU9dKtAg#v=onepage&q=Pectins%3A%20Extraction%2C%20Purification%2C%20Ch
- Mendoza, H. (2016). *EXTRACCIÓN DE PECTINAS A PARTIR DE MUCÍLAGO CONTENIDO EN LAS AGUAS MIELES DEL BENEFICIADO DE CAFÉ POR MACERACIÓN DINÁMICA Y ESTÁTICA*. Obtenido de <http://www.repositorio.usac.edu.gt/3327/1/H%C3%A9ctor%20Armando%20Mendoza%20Yalibat.pdf>
- Michail, A., Sigala, P., Grigorakis, S., & Makris, D. (2016). *Kinetics of ultrasound-assisted polyphenol extraction from spent filter coffee using aqueous glycerol*. *Chemical Engineering Communications*, 203(3), 407-413. Obtenido de <https://doi.org/10.1080/00986445.2015.1004667>
- Murthy, P., & Naidu, M. (2012). *Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review*. *Resources, Conservation and recycling*, 66, 45-58. Obtenido de https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344912000894?casa_token=WiG59yKtW2UAAAAA:wdqlDTkG3MacbjMRz2Vtu6_Z1iuE4AqHONBksB_Pwun1ge1ArNr-hugHJDTAYbyE7WFPnmXnr9g
- NCA. (s. f.). *National Coffee Association*. Obtenido de 10 Steps from Seed to Cup: <https://www.ncausa.org/about-coffee/10-steps-from-seed-to-cup>
- Pagán, G. (1996). *Degradación enzimática y características físicas y químicas de la pectina del bagazo de melocotón* ISBN: 89-89727-64-3 Depósito legal, S 54-98. *Server de publicaciones*. Universidad de Lleida. Obtenido de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8370/jpagan.pdf>

- Pañuela, A., & Sanz-Uribe, J. (2021). *Obtenga café de calidad en el proceso de beneficio. Cenicafé*. Obtenido de <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/4289>
- Prera, Z. (2000). *Elaboración de una mermelada de fresas baja en calorías, apta para personas diabéticas (Doctoral dissertation, Universidad del Valle de Guatemala)*. Obtenido de <https://repositorio.uvg.edu.gt/handle/123456789/197>
- Puerta, G., & Ríos, S. (2014). *Composición Química del mucílago de café según el tiempo de fermentación y refrigeración*. Obtenido de <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/478/1/arc062%2802%2923-40.pdf>
- Ramalakshmi, K., Kruba, I., & Rao, L. (2007). *Physicochemical characteristics of green coffee: Comparison of graded and defective beans. Journal of food science, 72(5), S333-S337*. Obtenido de https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2007.00379.x?casa_token=ybQJCaHTIioAAAAA%3A2o5MP5pcdyEg0oCTGQybNP5JUU48-00sdzTdeq4U91Eg4m7EY6r46aIzNQPqfxh8RxRp5gL0HIW22BcF
- Rao, L., & Ramalakshmi, K. (2015). *Use of microwaves to extract chlorogenic acids from green coffee beans. In Processing and Impact on Active Components in Food (pp. 583-590). Academic Press*.
- Rattan, S., Parande, A., Nagaraju, V., & Ghiwari, G. (2015). *A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing. Environ Sci Pollut Res 22, 6461–6472*. . Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4079-5>
- Ro, J., Kim, Y., Kim, H., Jang, S., Lee, H., Chakma, S., . . . Lee, J. (2013). *Anti-oxidative activity of pectin and its stabilizing effect on retinyl palmitate. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology, 17(3), 197*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2013.17.3.197>
- SCIJ. (2018). *Resolución N° 402-2018 (COMIECO-LXXXIII) de fecha 28/06/2018 y su Anexo: "Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:17 Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de los Alimentos"*. Obtenido de http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=87920&nValor3=114653&strTipM=TC
- Sengar, A., Rawson, A., Muthiah, M., & Kalakandan, S. (2020). *Comparison of different ultrasound assisted extraction techniques for pectin from tomato processing waste*.

- Ultrasonics Sonochemistry*, 61, 104812. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104812>
- Srivastava, P., & Malviya, R. (2011). *Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry— An overview*. Obtenido de <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/11534>
- Torres, L., Sanín, A., Arango, A., & Serna, J. (2019). *Caracterización fisicoquímica y microbiológica de aguas mieles del beneficio del café*. *Revista Ion*, 32(2), 59-66. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-100X2019000200059
- Uenojo, M., & Pastore, G. (2007). *Pectinases: aplicações industriais e perspectivas*. *Química Nova*, 30, 388-394.
- Valdespino-León, M., Calderón-Domínguez, G., Salgado-Cruz, M., Rentería-Ortega, M., Farrera-Rebollo, R., Morales-Sánchez, E., . . . Terrazas-Valencia, F. (2021). *Biodegradable electrosprayed pectin films: An alternative to valorize coffee mucilage*. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 2477-2494. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-020-01194-z>
- Voragen, A., Coenen, G., Verhoef, R., & Schols, H. (2009). *Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls*. *Structural Chemistry*, 20, 263-275. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Wang, X., Chen, Q., & Lü, X. (2014). *Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water*. *Food Hydrocolloids*, 38, 129-137. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.003>
- Wicker, L. (2004). *HYDROCOLLOIDS—PRACTICAL GUIDES FOR THE FOOD INDUSTRY*. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2004.35507.x>
- World Coffee Research. (2023). *Catálogo de Variedades*. Obtenido de <https://varieties.worldcoffeeresearch.org/es/varieties>
- Yeretzian, C. (2017). *Coffe*. *Springer Handbook of Odor*, 21-22. doi:10.1007/978-3-319-26932-0_6
- Zegada, V. (2015). *EXTRACCIÓN DE PECTINA DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE NARANJA POR HIDRÓLISIS ÁCIDA ASISTIDA POR MICROONDAS (HMO)*. *Investigación & Desarrollo*, 1(15), 65-76. Obtenido de

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2518-44312015000100007#:~:text=%E2%97%8F%20Estructura%20Qu%C3%ADmica%20de%20la,1007%20%5B3%5D.

Capítulo VII. Apéndices y Anexos

7.1 Apéndices

Apéndice A. Fotografías de análisis fisicoquímico realizado en el laboratorio al mucílago de café obtenido de las aguas mieles.

Figura 14

Evidencia determinación densidad indirecta del mucílago de café.



Figura 15

Evidencia medición el pH del mucílago de café.

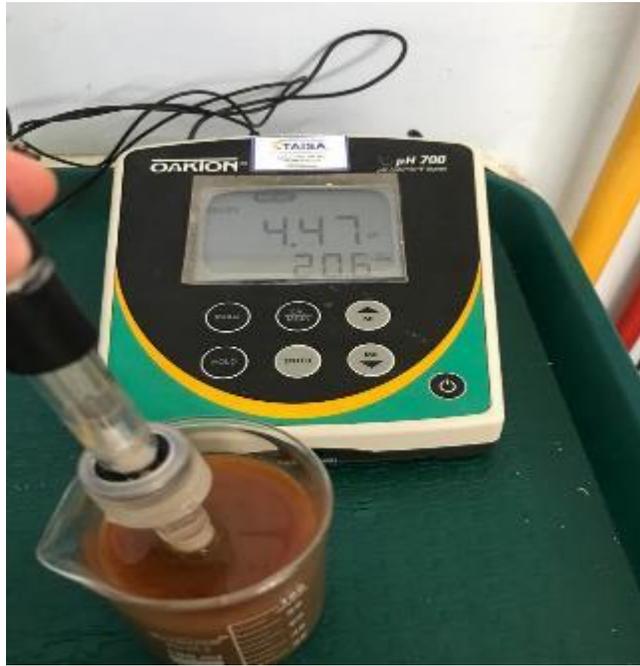


Figura 16

Recipiente estéril para toma de muestras microbiológicas.



Figura 17

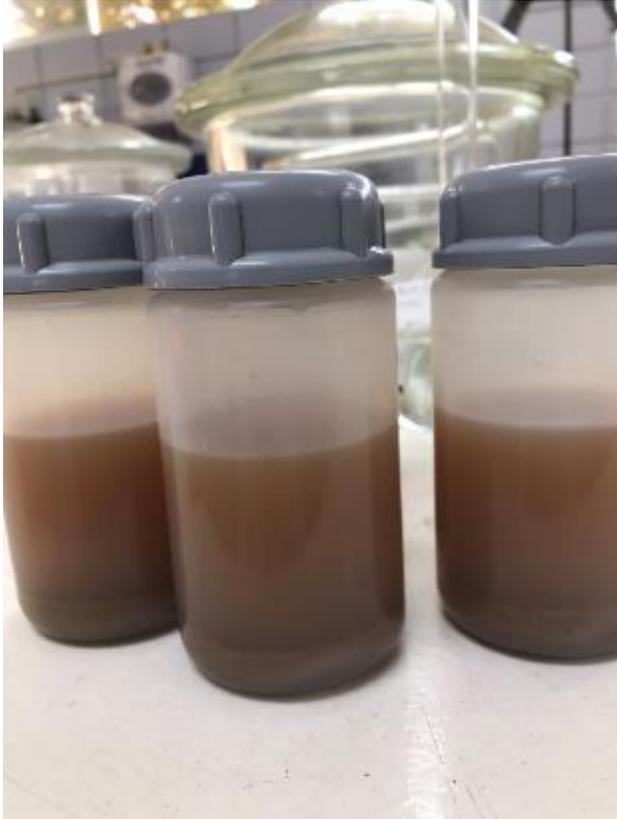
Evidencia filtración de las aguas mieles.



Apéndice B. Fotografías proceso de extracción de pectinas.

Figura 18

Evidencia primer centrifugado.



Nota: Frascos luego de realizar la primera centrifugación, se observa la separación de fases.

Figura 19

Evidencia del filtrado al vacío.

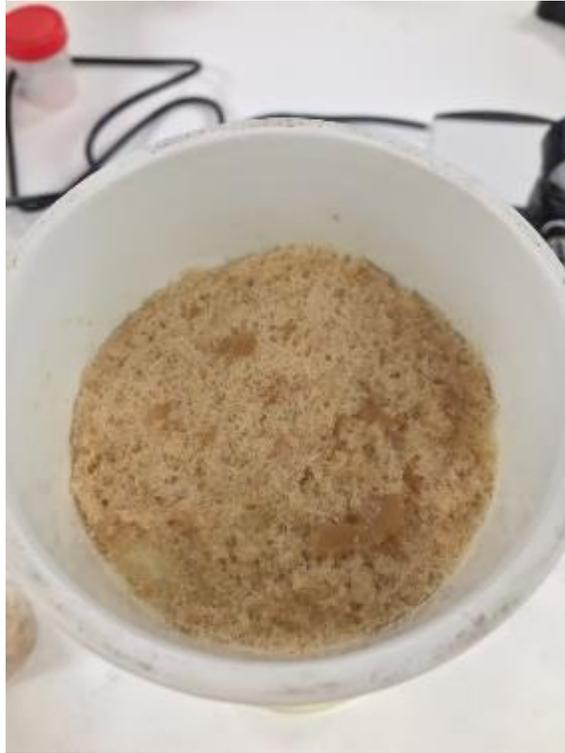


Figura 20

Evidencia del precipitado de pectina.



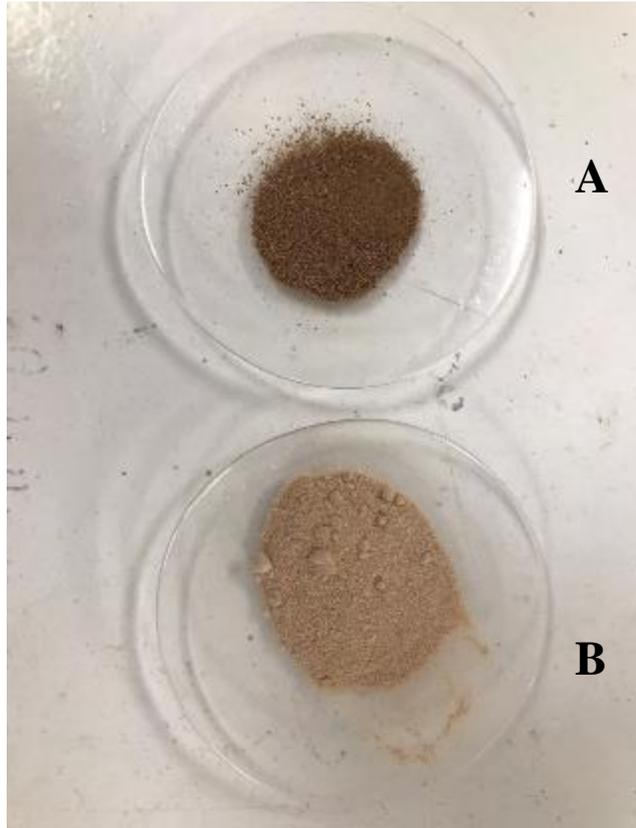
Figura 21

Evidencia proceso de liofilización de la nectina.



Figura 22

Pectina extraída en contraste con pectina comercial.



Nota: La pectina A corresponde a la extraída del mucílago contenido en las aguas mieles, mientras que la B es pectina comercial.

Apéndice C. Fotografías de la prueba de viscosidad.

Figura 23

Evidencia medición de viscosidad.



7.2 Anexos

Anexo A. Hoja de seguridad del ácido cítrico

Figura 24

Hoja de seguridad del ácido cítrico.

Propiedades Físicas y Químicas	
Estado físico	Sólido.
Apariencia y olor	Gránulos, cristales o polvos finos cristalinos incoloros a blancos., Sin olor.
Concentración	99,0 – 102,0 %
pH	2,1 (solución 0,1M a 20 °C) – 1,2 (solución al 20 % a 20 °C).
Temperatura ebullición	175 °C (se descompone).
Densidad (Agua=1)	1,540 (Ácido Cítrico Monohidratado) – 1,665 kg/L a 20 °C (Ácido Cítrico)
Solubilidad en agua	Muy buena solubilidad en Agua. Buena solubilidad en Alcohol Metílico, Alcohol Propílico y Alcohol Amílico - Moderada solubilidad en Acetato de Amilo, Acetato de Etilo y Dietil Eter - Insoluble en Cloroformo.
Primeros Auxilios	
Inhalación: trasladar a la persona donde exista aire fresco. - En caso de paro respiratorio, emplear método de reanimación cardiopulmonar. - Si respira dificultosamente se debe suministrar Oxígeno. - Conseguir asistencia médica.	
Contacto con la piel: lavar con abundante Agua, hasta retirar completamente el producto de la piel. Sacarse la ropa contaminada y luego lavarla. De mantenerse alguna molestia, solicitar ayuda médica.	
Contacto con los ojos: lavarse con abundante Agua en un lavadero de ojos, por 5 minutos como mínimo, separando los párpados. De continuar la irritación, recurrir a un centro de atención médica.	
Ingestión: lavar la boca con bastante Agua. Dar a beber abundante agua. Enviar a un servicio médico, de haber alguna molestia.	

Nota: Tomado de Extracción de pectinas a partir de mucílago contenido en las aguas mieles del beneficiado de café por maceración dinámica y estática, Mendoza, 2016.

Anexo B. Hoja de seguridad del ácido cítrico

Figura 25

Especificaciones internacionales de la calidad de pectina.

	ESPECIFICACION INTERNACIONAL	U E E440(i) pectina	U E E440(ii) pectina amidada	FAO/WHO JECFA Pectina	FDA/FCC Pectina	USP Pectina
1.	Pérdida de secado	max 12%	max 12%	max 12%	max 12%	max 10%
2.	Ceniza insoluble en ácido (3 N HCl)	max 1%	max 1%	max 1%	max 1%	-
3.	Insolubles totales	-	-	max 3%	max 3%	-
4.	Metilsulfato de sodio	-	-	-	max 0.1%	-
5.	alcohol metil, etil, o isopropílico libre (en bs)	max 1%	max 1%	max 1%	max 1%	-
6.	Alcohol metílico	-	-	-	-	max 0.3%
	Alcohol etílico	-	-	-	-	max 0.5%
	Alcohol isopropílico	-	-	-	-	max 0.5%
7.	Dióxido de azufre (en bs)	max 50 ppm	max 50 ppm	max 50 ppm	max 50 ppm	-
8.	Contenido de nitrógeno (pectina) (en bs y libre de ceniza)	max 1%	-	max 2.5%	-	-
9.	Contenido de nitrógeno (pectina amidada) (en bs y libre de ceniza)	-	max 2.5%	max 2.5%	-	-
10.	Acido galacturónico (en bs y libre de ceniza)	min 65%	min 65%	min 65%	-	min 74%
11.	Contenido de metoxilo (en bs pectina no estandarizada)	-	-	-	-	min 6.7%
12.	Grado de amidación	-	max 25%	max 25%	max 25%	-
13.	Azúcar y ácidos orgánicos	-	-	-	-	max 160 mg/g
14.	Arsénico	max 3 ppm	max 3 ppm	-	-	max 3 ppm
15.	Plomo	max 5 ppm	max 5 ppm	max 5 ppm	max 5 ppm	max 5 ppm
16.	Cadmio	max 1 ppm	max 1 ppm	-	-	-
17.	Mercurio	max 1 ppm	max 1 ppm	-	-	-
18.	Metales pesados (como plomo)	max 20 ppm	max 20 ppm	-	-	-
19.	Pesticidas	Acorde a regulaciones generales alimenticias				
20.	Gérmenes patógenos	Acorde a regulaciones generales alimenticias				Ausencia de especies de salmonella
21.	Impurezas orgánicas volátiles	Acorde a regulaciones generales alimenticias				Límites definidos

--= ninguna especificación

USP = farmacopea USA

JECFA = comité Ad-hoc en aditivos alimenticios

bs = base seca

FCC = Codex químico alimenticio

FDA = Administración federal de drogas y alimentos

UE = Unión Europea

FAO/WHO= Organización mundial de agricultura /organización mundial de la salud

Nota: Tomado de Evaluación del rendimiento de extracción de pectina en aguas mieles del beneficiado de café procedentes de desmucilaginado mecánico, por García, 2009.