



**UNIVERSIDAD DE  
MANIZALES**

**Tesis Doctoral**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOHERBICIDA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS  
OBTENIDOS A PARTIR DEL MUCÍLAGO DEL CAFÉ: UN ENFOQUE SOSTENIBLE  
PARA EL CONTROL DE ARVENSES”**

**Santiago Jaramillo Cardona**

**Universidad de Manizales  
Facultad de Ciencias Contables, Económicas y Administrativas  
Doctorado en Desarrollo Sostenible  
Manizales, Colombia  
2025**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOHERBICIDA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS  
OBTENIDOS A PARTIR DEL MUCÍLAGO DEL CAFÉ: UN ENFOQUE SOSTENIBLE  
PARA EL CONTROL DE ARVENSES”**

**Santiago Jaramillo Cardona**

**Informe de investigación presentado como requisito para optar al título de Doctor en  
Desarrollo Sostenible**

**Director (a):**

**PhD. Gloria María Restrepo Franco**

**Asesor (a):**

**PhD. Nelson Rodríguez Valencia**

**Línea de Investigación: Biosistemas Integrados**

**Universidad de Manizales**

**Facultad de Ciencias Contables, Económicas y Administrativas**

**Doctorado en Desarrollo Sostenible**

**Manizales, Colombia**

**2025**

*Dedicatoria*

*A mis padres Oscar y Olga Lucía, a mi esposa Ana  
María, por su apoyo incondicional, amor y  
acompañamiento, y en especial al Dr. Hernando Duque por  
sus invaluable enseñanzas a lo largo de mi vida  
profesional*

## **Agradecimientos**

A la Universidad de Manizales y al Centro Nacional de Investigaciones del Café (CENICAFÉ) por sus aportes académicos, científicos y económicos durante el transcurso del proyecto de investigación suscrito a la Disciplina de Fitotecnia de Cenicafé con el código FIT101006.

A la Dra. Gloria María Restrepo, por la dirección, asesoramiento, dedicación y calidad humana manifestada durante mi proceso de formación doctoral, especialmente durante la estructuración y desarrollo metodológico de mi tesis doctoral. Al Dr. Jhon Fredy Betancur por su acompañamiento y asesoría en el marco de la línea de investigación en Biosistemas Integrados. Al Dr. Diego Hernández por sus valiosas enseñanzas y consejos desde la dirección del Doctorado.

A los Doctores Nelson Rodríguez, Luis Fernando Salazar, Rubén Darío Medina, Álvaro Gaitán, José Raúl Rendón, Valentina Osorio, Luz Fanny Echeverry, Luis Carlos Imbachi y Andrés Felipe León, investigadores de Cenicafé por sus inapreciables aportes, asesorías y permanente apoyo científico durante la realización del trabajo de investigación. Quiero además manifestar un agradecimiento muy especial a Cristian Arboleda, Alexander Jaramillo y José Farid López por su ardua colaboración y soporte en las actividades desarrolladas en los laboratorios e invernaderos de Cenicafé.

---

## Resumen

### **Evaluación del efecto bioherbicida de ácidos orgánicos obtenidos a partir del mucílago del café**

La aplicación de herbicidas de síntesis química en las fincas cafeteras es una práctica que afecta la sostenibilidad ambiental, la inocuidad del café y la salud de los operarios que aplican dichos productos. Los herbicidas de origen biológico también llamados “bioherbicidas” han sido catalogados internacionalmente como una alternativa sostenible para sustituir algunas moléculas químicas que están siendo restringidas por grandes importadores de café como Japón y la Unión Europea. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto bioherbicida de los ácidos orgánicos que se generan durante procesos fermentativos del mucílago del café presente en las aguas residuales del beneficio. El desarrollo metodológico de la investigación se realizó en dos etapas: la primera etapa se desarrolló en laboratorio y consistió en una caracterización física, química y biológica de las aguas residuales fermentadas (sustratos) provenientes de dos métodos de lavado desarrollados por Cenicafé, (i) Tanque Tina® y (ii) Ecomill®. La segunda etapa se llevó a cabo en condiciones de casa de malla y su objetivo fue evaluar bajo un diseño de bloques completos al azar, el porcentaje de control de arvenses y la persistencia del control obtenido al aplicar dos tratamientos de los dos sustratos fermentados, tres tratamientos de ácidos orgánicos, un testigo relativo correspondiente al herbicida glufosinato de amonio y un testigo absoluto sin aplicación. Durante la primera etapa se realizaron mediciones de Sólidos Totales (ST), pH, Acidez Titulable (AT), una caracterización microbiológica y una cuantificación de los ácidos orgánicos generados durante la fermentación aeróbica de los dos sustratos mediante la técnica de cromatografía líquida (HPLC). Durante la segunda etapa se realizó una caracterización botánica de las especies de arvenses presentes en las unidades experimentales, posteriormente se estimó el porcentaje de control de arvenses obtenido para cada uno de los tratamientos evaluados mediante un análisis comparativo de las variaciones del porcentaje de cobertura verde antes y después de la aplicación de los tratamientos para lo cual se utilizó la aplicación computacional Canopeo® desarrollada por la Universidad estatal de Oklahoma. Dado que el análisis de varianza (ANOVA) mostró efecto de la interacción entre el tiempo de medición y los tratamientos, se realizó el análisis de las diferencias de los efectos simples mediante un análisis de comparación múltiple con ajuste de Bonferroni al 5%, con el objetivo de identificar la respuesta a través del tiempo en términos de

porcentaje de control y/o persistencia asociada a cada tratamiento. La prueba de comparación mostró que la respuesta de los tratamientos no fue la misma en todos los tiempos de evaluación, destacándose que para los días 3, 7 y 14, los tratamientos 1 y 2 (filtrados de las aguas residuales del lavado del café) superaron los porcentajes de control obtenidos con los tratamientos 3, 4 y 5 (ácidos orgánicos en disolución) ( $P_{adj} < 0,0001$ ). Adicionalmente la prueba mostró que no hubo diferencias estadísticas significativas para los tratamientos 4 y 5, frente al testigo absoluto en donde no se aplicó ningún producto a partir del día 14.

**Palabras clave:** Café, Economía circular, Bioherbicida, Aguas residuales, Bioinsumos.

## **Abstract**

### **Evaluation of the bioherbicidal effect of organic acids obtained from coffee mucilage**

The application of chemically synthesized herbicides on coffee farms is a practice that affects environmental sustainability, the safety of the coffee produced and the health of the operators who apply these products. Herbicides of biological origin, also called “bioherbicides,” have been listed internationally as a sustainable alternative to replace some chemical molecules that are being restricted by large coffee importers such as Japan and the European Union. The objective of this research was to evaluate the bioherbicidal effect of organic acids that are generated during fermentation processes of coffee mucilage present in postharvest wastewater. The methodological development of the research was conducted in two stages: the first stage was carried out in the laboratory and consisted of a physical, chemical and biological characterization of the fermented wastewater (substrates) coming from two washing methods developed by Cenicafe, (i) Tanque Tina® and (ii) Ecomill®. The second stage was carried out in greenhouse conditions and consisted of evaluating, under a complete randomized block design, the percentage of weed control and the persistence of control obtained by applying two treatments of the two fermented substrates, three treatments of organic acids, one relative check corresponding to the herbicide glufosinate ammonium and one absolute check without application. During the first stage, measurements of Total Solids (TS), pH, Titratable Acidity (TA), a microbiological characterization and a quantification of the organic acids generated during the aerobic fermentation of the two substrates

were carried out using the liquid chromatography (HPLC) technique. During the second stage, a botanical characterization of the weed species present in the experimental units was carried out, subsequently the percentage of weed control obtained for each of the treatments was estimated through a comparative analysis of the variations in the percentage of green coverage before and after the application of the treatments for which a computer app developed by the Oklahoma State University and named Canopeo® a was used. Since the analysis of variance (ANOVA) showed an effect of the interaction between the measurement time and the treatments, the analysis of the differences of the simple effects was carried out using a multiple comparison analysis with Bonferroni adjustment at 5%, with the objective of identifying the response over time in terms of percentage of control and/or persistence associated with each treatment. The comparison test showed that the response of the treatments was not the same at all evaluation times, highlighting that for days 3, 7 and 14, treatments 1 and 2 (filtered wastewater from coffee washing) exceeded the control percentages obtained with treatments 3, 4 and 5 (organic acids in solution) ( $P_{adj} < 0.0001$ ). Additionally, the test showed that there were no significant statistical differences for treatments 4 and 5, compared to the absolute control where no product was applied from day 14 onwards.

**Keywords:** Coffee, Circular economy, Bioherbicide, Wastewater, Bioinputs.

---

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>16</b>
<b>1. DISEÑO TEÓRICO</b>	<b>20</b>
1.1 Descripción del área problemática	20
1.2 Antecedentes investigativos	21
1.3 Justificación de la investigación	30
1.4 Objetivo General	32
1.4.1 Objetivos específicos	32
1.5 Categorías de análisis	32
1.5.1 Hipótesis	32
<b>2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b>	<b>33</b>
2.1 La bioeconomía: una alternativa para aumentar la sostenibilidad de los sistemas de producción de café en Colombia	33
2.2 Las aguas residuales del café: un contaminante con un alto potencial para la producción de bioinsumos para la caficultura colombiana	35
2.3 Las arvenses y su manejo integrado en los sistemas de producción de café	43
2.4 Uso potencial de los ácidos orgánicos de la fermentación de las aguas residuales del café como sustancias bioherbidas	46
2.5 Determinación del porcentaje de control de arvenses mediante el análisis comparativo de la Cobertura Verde Fraccional del Dosel (CVF) estimada con la aplicación digital Canopeo®	49
<b>3. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>51</b>
3.1 Tipo de investigación	51

---

<b>3.2</b>	<b>Población y muestreo</b>	<b>51</b>
<b>3.3</b>	<b>Procedimiento de investigación</b>	<b>52</b>
3.3.1	Etapa 1. Caracterización química, física y microbiológica de aguas residuales del lavado del café sometidas a procesos prolongados de fermentación aeróbica	52
3.3.2	Etapa 2. Evaluación en casa de malla del efecto bioherbicida de los filtrados fermentados de los dos sustratos de las aguas residuales del lavado del café	55
<b>3.4</b>	<b>Técnicas e instrumentos</b>	<b>56</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>69</b>
<b>4.1.</b>	<b>Análisis físico de los sustratos de aguas residuales del lavado del café sometidos a fermentación aeróbica prolongada</b>	<b>69</b>
<b>4.2.</b>	<b>Análisis químico de los sustratos de aguas residuales del lavado del café sometidos a fermentación aeróbica prolongada</b>	<b>73</b>
<b>4.3.</b>	<b>Análisis microbiológico de los sustratos de aguas residuales del lavado del café sometidos a fermentación aeróbica prolongada</b>	<b>84</b>
<b>4.4.</b>	<b>Análisis del efecto bioherbicida de la aplicación foliar de filtrados fermentados de los dos sustratos de aguas residuales del lavado, ácidos orgánicos en disolución y el herbicida comercial glufosinato de amonio</b>	<b>96</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>106</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>119</b>

---

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales características químicas de las aguas residuales provenientes del beneficio del café (Fuente: Rodríguez, 1999). .....	38
Tabla 2. <i>Especies de microorganismos identificadas por grupo funcional en las mieles del Ecomill®</i> .....	88
Tabla 3. <i>Especies de microorganismos identificadas por grupo funcional en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®</i> .....	93
Tabla 4. <i>Características botánicas de las especies de arvenses identificadas mediante observación visual en las unidades experimentales en condiciones de casa de malla (Adaptado de Salazar, 2021).</i> .....	96
Tabla 5. <i>Promedio y error estándar para la cobertura verde fraccional de las arvenses por tratamiento de acuerdo a los días después de aplicación</i> .....	102

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Prácticas del beneficio del café y toma de muestras de aguas residuales del lavado (Foto 1. Recibo del café cereza en tolva; Foto 2. Clasificación de cerezas por densidad en separador hidráulico; Foto 3. Despulpado; Foto 4. Clasificación por tamaño del pergamino en baba en zaranda perforada; Foto 5. Fermentación del pergamino en baba en tanque; Foto 6. Determinación de punto de lavado con Fermaestro®; Foto 7. Lavado y colecta de mieles del Ecomill® LH 300; Foto 8. Lavado por agitación en Tanque tina®; Foto 9. Colecta de aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® Determinación de pH; Foto 10. Inicio de fermentación aeróbica de las aguas residuales del lavado del café).</i>	57
<i>Figura 2. Muestreo, pesaje inicial, secado mecánico y pesaje final de sólidos totales de los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café (Foto 1. Montaje de muestras en cápsulas de porcelana de 100 mL; Foto 2. Secado de muestras; Foto 3. Pesaje en balanza electrónica).</i>	58
<i>Figura 3. Determinación de pH y Acidez Titulable de mieles del Ecomill® y aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® (Foto 1. Muestras de 100 mL de cada sustrato; Foto 2. Determinación de pH; Foto 3. Titulación de muestras con NaOH al 16%).</i>	60
<i>Figura 4. Muestreo, procesamiento y cuantificación de ácidos orgánicos acético, cítrico y láctico de los dos sustratos de aguas residuales del café mediante cromatografía líquida HPLC (Foto 1. Submuestras de 25 mL de cada sustrato; Foto 2. Centrifugación; Foto 3. Separación de sobrenadantes; Foto 4. Filtrado; Foto 5. Deposición de muestras; Foto 6. Análisis de muestras en HPLC).</i>	62
<i>Figura 5. Colecta, inoculación, incubación y observación de muestras para análisis microbiológico de los dos sustratos de aguas residuales del lavado sometidas a fermentación prolongada (Foto 1. Colecta en tubos Falcon estériles de 50 mL de cada sustrato a los 0, 4, 8, 12 y 16 días de fermentación; Foto 2. Siembra de muestras en medios de cultivo; Foto 3. Incubación a 32°C de muestras sembradas; Foto 4. Estereoscopía; Foto 5. Microscopía).</i>	63
<i>Figura 6. Muestreo de arvenses en campo y disposición de las unidades experimentales en casa de malla (Foto 1. colecta de cespedones en bandejas plásticas de 1400 cm<sup>3</sup>; Foto 2. Distribución de las bandejas con cespedones dentro de la casa de malla según BCA de 5 Bloques x 7 Tratamientos; Foto 3. Crecimiento foliar de las arvenses en casa de malla; Foto 4. Caracterización botánica de las especies de arvenses).</i>	65
<i>Figura 7. Filtrado de aguas residuales del lavado del café sometidas a fermentación aeróbica de 16 días (Foto 1. Filtros de PVC; Foto 2. Llenado de filtros con gravilla y arena lavada de río; Foto 3. Llenado de filtros con los dos sustratos; Foto 4. Decantación de filtrados por gravedad).</i>	66
<i>Figura 8. Diluciones, preparación de tratamientos de ácidos orgánicos y testigo comercial (Foto 1. Ácido acético al 96%; Foto 2. Monohidrato de ácido cítrico al 100%; Foto 3. Pesaje de Monohidrato de ácido cítrico previo a dilución; Foto 4. Envase de tratamientos; Foto 5. Glufosinato de amonio 150 gramos de I.A. por litro).</i>	66
<i>Figura 9. Equipos de aspersión y calibración de descarga (Foto 1. Bomba manual de espalda; Foto 2. Regulador de presión CF-Valve; Foto 3. Boquilla de abanico plano 8001; Foto 4. Calibración de uniformidad de aspersión; Foto 5. Aplicación de los tratamientos en cada unidad experimental).</i>	67
<i>Figura 10. Estimación en casa de malla de los porcentajes de cobertura de los diferentes tratamientos con la app Canopeo® (Foto 1. Logo app Canopeo®; Foto 2. Marco de madera utilizado para el análisis de las imágenes; Foto 3. Estimación de porcentaje de cobertura verde por Canopeo®; Foto 4. Estación meteorológica portátil; Foto 5. Datalogger y modem para registro y transmisión de datos climáticos).</i>	68
<i>Figura 11. Concentración de sólidos totales en miligramos por litro de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica.</i>	70

Figura 12. <i>Concentración de sólidos totales en miligramos por litro de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	71
Figura 13. <i>Concentración de DQO en miligramos por litro de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	72
Figura 14. <i>Concentración de DQO en miligramos por litro de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	72
Figura 15. <i>Comportamiento del pH de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> . .....	74
Figura 16. <i>Comportamiento del pH de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	74
Figura 17. <i>Comportamiento de la acidez titulable en mL de NaOH de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	76
Figura 18. <i>Tendencia logarítmica de los valores registrados de acidez titulable en mL de NaOH en las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	77
Figura 19. <i>Comportamiento de la acidez titulable en mL de NaOH de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> . ....	78
Figura 20. <i>Tendencia logarítmica de los valores registrados de acidez titulable en ml de NaOH en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	79
Figura 21. <i>Comportamiento de la acidez titulable en mg de CaCO<sub>3</sub>/L de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	80
Figura 22. <i>Comportamiento de la acidez titulable en mg de CaCO<sub>3</sub>/L de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	80
Figura 23. <i>Cambios en las concentraciones de ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico en (g/L) de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	81
Figura 24. <i>Cambios en las concentraciones de ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico en (g/L) de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica</i> . ....	82
Figura 25. <i>Mapas de calor (Heatmap) de las concentraciones de ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico en (g/L) de los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café sometidas a 16 días de fermentación aeróbica</i> .....	83
Figura 26. <i>Perfil cromatográfico de muestras de Ecomill, correspondiente a la identificación de ácidos orgánicos a 210 nm: ácido cítrico (11.47 min), ácido láctico (16.67 min) y ácido acético a 19.62 min)</i> . .	84
Figura 27. <i>Perfil cromatográfico de muestras del tanque tina de los ácidos orgánicos identificados a 210 nm: ácido cítrico (11.60 min), ácido láctico (16.73 min) y ácido acético a 19.76 min)</i> . ....	84
Figura 28. <i>Riqueza en número de especies identificadas por grupo funcional en las mieles del Ecomill®</i> . .....	85
Figura 29. <i>Variaciones en la riqueza de especies pertenecientes a los diferentes grupos funcionales identificados en las mieles del Ecomill® a lo largo de 16 días de fermentación aeróbica</i> . ....	87
Figura 30. <i>Variaciones en la abundancia de especies pertenecientes a los diferentes grupos funcionales identificados en las mieles del Ecomill® a lo largo de 16 días de fermentación aeróbica</i> . ....	88
Figura 31. <i>Riqueza en número de especies identificadas por grupo funcional en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®</i> .....	90
Figura 32. <i>Variaciones en la riqueza de especies pertenecientes a los diferentes grupos funcionales identificados en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® a lo largo de 16 días de fermentación aeróbica</i> . ....	91

---

Figura 33. Variaciones en la abundancia de especies pertenecientes a los diferentes grupos funcionales identificados en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® a lo largo de 16 días de fermentación aeróbica. ....	92
Figura 34. Diferencias en la diversidad de especies entre las mieles del Ecomill® y las aguas del Tanque Tina® en diagrama de cajas. ....	94
Figura 35. Imágenes de microscopía de algunos microorganismos asociados a la fermentación de aguas residuales del café sometidas a fermentación aeróbica de 16 días (Foto 1. <i>Actinomyces</i> sp; Foto 2. <i>Saccharomyces</i> sp; Foto 3. <i>Streptomyces</i> sp; Foto 4. <i>Lactobacillus</i> sp; Foto 5. <i>Rhodococcus</i> sp; Foto 6. <i>Staphylococcus</i> sp; Foto 7. <i>Candida</i> sp; Foto 8. <i>Nocardia</i> sp) .....	96
Figura 36. Porcentaje de frecuencia de cada una de las especies de arvenses identificadas en las unidades experimentales en relación con el tipo de hoja (hoja ancha: eudicotiledónea, hoja angosta: monocotiledónea) .....	98
Figura 37. Cambios en los porcentajes de cobertura verde fraccional de las arvenses, asociados a cada uno de los tratamientos a los 3, 7, 14 y 21 días después de la aplicación. ....	101

---

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
AU	Absorbancia
cps	café pergamino seco
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EM	Ecomill®
FAO	Food and Agriculture Organization
FNC	Federación Nacional de Cafeteros de Colombia
FM	Fermaestro®
IA	Ingrediente Activo
MIA	Manejo Integrado de Arvenses
MRL	Maximum Residue Limit
OIC	Organización Internacional del Café
PEF	Product Environmental Footprint
PIB	Producto Interno Bruto
SBN	Soluciones Basadas en la Naturaleza
SINIA	Sistema Nacional de Insumos Agropecuarios
SHTS	Separador Hidráulico de Tolva y Tornillo Sinfín
SMTA	Sistema Modular de Tratamiento Anaeróbico de Aguas Residuales
TRL	Technological Readiness Level (Nivel de Madurez Tecnológica)
UE	Unidades experimentales
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

## INTRODUCCIÓN

Durante el último siglo, el café ha sido el principal producto agrícola de exportación de Colombia y un importante dinamizador del desarrollo económico y social de la nación. Actualmente el café es el cultivo con mayor área sembrada en el país, abarcando cerca de 840.000 hectáreas que son cultivadas por más de 550.000 familias que producen el grano en más de 660.000 fincas, cuya área promedio es menor a dos hectáreas por productor.

El modelo productivo del café en Colombia está soportado en una caficultura de base campesina pero altamente tecnificada. Dicha tecnificación es el resultado de los esfuerzos gremiales de los caficultores colombianos quienes por más de 95 años han invertido en ciencia, tecnología e innovación aplicada al mejoramiento de los sistemas productivos, a la extensión rural, al cooperativismo, a la comercialización y venta asegurada, así como a la modernización de la cadena de suministros y de los procesos de transformación de un producto reconocido internacionalmente por su calidad excepcional.

La tecnificación de los sistemas de producción cafetera se debe en gran medida a la investigación científica y tecnológica que ha desarrollado durante 87 años el Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé), empresa de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (FNC), quien en procura del bienestar de los caficultores colombianos realiza investigaciones científicas y tecnológicas en temas como: mejoramiento genético de variedades resistentes a la roya del café, manejo agronómico del cultivo, prácticas de conservación de suelos y nutrición, manejo integrado de plagas y enfermedades, economía cafetera, cosecha y poscosecha, calidad del café, entre muchos otros.

Siguiendo el modelo clásico de transmisión de conocimiento, las tecnologías desarrolladas por Cenicafé son transferidas a los caficultores por un equipo de más de 1000 profesionales pertenecientes al Servicio de Extensión de la FNC quienes mediante visitas técnicas a fincas, campañas educativas, días de campo, reuniones, giras, entrega de material divulgativo, cursos y capacitaciones; promueven la adopción de las prácticas que inciden positivamente la productividad y la calidad del café, así como la sostenibilidad económica, social y ambiental durante el proceso productivo.

La sostenibilidad económica de los sistemas de producción cafetera se fundamenta principalmente en producir el café de una manera rentable y en diversificar los ingresos mediante

la venta competitiva de otros productos agropecuarios producidos en las fincas. La rentabilidad del negocio cafetero depende de tres factores: (i) la productividad, (ii) los costos de producción y (iii) el precio de venta. La productividad depende a su vez de la interacción entre factores relacionados con el genotipo (variedad de café), el ambiente (oferta climática y de suelos) y el manejo (oportunidad y pertinencia en las prácticas agronómicas que se realizan en el cultivo). Los costos de producción a su vez dependen principalmente del costo de los insumos (semillas, fertilizantes, pesticidas, herramientas, maquinaria, etc.) y del costo de la mano de obra requerida para las diferentes labores del cultivo (siembra, enmiendas, fertilización, manejos fitosanitarios, manejo integrado de arvenses y cosecha) y para el beneficio del café (manejo en la etapa de poscosecha). Por su parte, el precio interno de venta del café depende directamente del precio internacional de los cafés arábigos suaves lavados que se fija de acuerdo con la cotización diaria del cierre en la bolsa de Nueva York y a la tasa de cambio en pesos colombianos por dólar estadounidense, por esta razón no existe ningún grado de influencia gremial sobre este precio cuya alta volatilidad se deriva principalmente de factores relacionados con la oferta y la demanda internacional de café.

La sostenibilidad social de la caficultura se relaciona con procurar el bienestar humano a través de los beneficios directos o indirectos que perciben las personas y las comunidades dedicadas a la actividad cafetera o que se encuentran asentadas en las diferentes regiones en donde se produce el grano. Algunos factores como el empleo rural, servicios públicos, educación, salud, vivienda, servicios culturales, inclusión, participación ciudadana, infraestructura y la seguridad alimentaria, forman parte de los beneficios individuales y colectivos que aportan al desarrollo social sostenible de los departamentos cafeteros de Colombia. En este sentido, cabe subrayar las inmensas inversiones que ha realizado históricamente el gremio cafetero para la construcción de vivienda rural, escuelas, infraestructura vial, puestos de salud, acueducto y alcantarillado y demás servicios públicos para las comunidades cafeteras de Colombia. De igual forma, los programas de crédito rural y de seguridad alimentaria promovidos por la FNC han contribuido enormemente a la prosperidad de más de 600 municipios cafeteros ubicados en 23 departamentos. Adicionalmente, el cultivo del café en Colombia es responsable de más de 730.000 empleos directos, lo que equivale al 25% del empleo rural a nivel nacional, asimismo el sector cafetero colombiano contribuye con el 8,9% del PIB (Producto Interno Bruto) agropecuario nacional (Conpes, 2019).

La sostenibilidad ambiental en las fincas cafeteras por su parte, comprende todas aquellas acciones encaminadas a garantizar, conservar y regenerar la salud de los ecosistemas, la biodiversidad, la calidad del agua y del suelo, los servicios ecosistémicos, la captura de carbono, la transición hacia el uso de energías limpias y bioinsumos, el aprovechamiento sostenible de los residuos y el cuidado del medio ambiente durante el proceso productivo del café. Las investigaciones adelantadas por Cenicafé orientadas a lograr una producción ambientalmente sostenible han comprendido numerosos estudios de conservación de suelos enfocados a la reducción de la pérdida de suelo por efecto de la erosión hídrica, la resistencia genética de las variedades de café a enfermedades como la roya del café que redujo enormemente la necesidad de uso de fungicidas de síntesis química, el desarrollo de estrategias de manejo integrado de insectos plaga como la broca del café en donde la implementación de prácticas de manejo cultural y el control biológico con enemigos naturales tales como hongos entomopatógenos, depredadores y parasitoides han disminuido notoriamente la dependencia de uso de los insecticidas químicos para su control. Adicionalmente, el desarrollo de tecnologías para el beneficio ecológico de café como el Becolsub® y el Ecomill® contribuyeron a la reducción de la cantidad de agua requerida para el lavado del café, pasando de volúmenes de más de 40 litros de agua para producir un kilogramo de café pergamino seco (cps) a volúmenes de 0,5 litros de agua por kilogramo de cps. En cuanto al tratamiento de aguas residuales provenientes del beneficio del café, la investigación y desarrollo de los sistemas modulares de tratamiento anaeróbico de aguas residuales (SMTA) y de los filtros verdes (sistemas de cero descarga) han contribuido no sólo al cumplimiento de la normativa ambiental vigente para el manejo de vertimientos sino a la reducción sustancial de la contaminación del suelo y de los cuerpos de agua superficiales como ríos y quebradas.

En los últimos años, la producción limpia y sostenible del café se ha convertido en un requisito fundamental exigido por los principales países importadores, quienes han impuesto una serie de restricciones de uso de algunos insumos químicos que no sólo afectan la inocuidad de la bebida sino que además afectan negativamente la salud de los ecosistemas en donde se produce el grano y de las personas que aplican este tipo de productos. Según la Organización Internacional del Café (OIC), existen límites máximos de residuos - MRL (por su sigla en inglés, *Maximum Residue Limits*) para 32 ingredientes activos de pesticidas que están incluidos en el *Codex alimentarius* y que restringen tanto la comercialización de café verde como de café tostado en algunos mercados internacionales como Europa y Japón. Los principales pesticidas químicos

utilizados en el cultivo del café se dividen tres grandes grupos: (i) insecticidas para el control de insectos plagas, (ii) fungicidas para el control de los hongos causantes de enfermedades y (iii) herbicidas para el control químico de las arvenses también conocidas como malezas o malas hierbas.

En el grupo de los insecticidas, algunas moléculas tradicionalmente usadas en la caficultura como el clorpirifos, clorantniliprole, imidacloprid, cipermetrina, y tiametoxam presentan en la actualidad límites máximos de residuos que limitan su permanencia en el mercado, a pesar de que a la fecha no tienen sustitutos biológicos de similar eficacia. Dentro del grupo de los fungicidas que presentan límites máximos de residuos están incluidas moléculas como el propiconazole, triadimefon, tebuconazole y pyraclostrobin comúnmente usadas para el control químico de la roya del café causada por el hongo *Hemileia vastatrix*. En cuanto a las moléculas herbicidas que presentan límites de restricción para el cultivo del café se encuentran el glifosato, paraquat, glufosinato de amonio y fluazifop-butyl (Codex Alimentarius FAO-WHO, 2024).

Ante esta nueva exigencia condicionante para acceso futuro del café colombiano a los mercados internacionales, las agendas de investigación a nivel mundial están dirigiendo sus esfuerzos al desarrollo de insumos de origen biológico también llamados “*bioinsumos*”, como una alternativa sostenible para la sustitución progresiva de los pesticidas y fertilizantes de síntesis química que presenten límites de restricción para alimentos de consumo humano como el café. En este contexto, el presente trabajo plantea investigar a nivel de laboratorio, (i) la dinámica de producción de algunos ácidos orgánicos que han sido reportados en la literatura por su acción bioherbicida y que se generan mediante procesos fermentativos aeróbicos de sustratos orgánicos como las aguas residuales del café las cuales están constituidas mayormente por el mucílago degradado que es retirado del grano de café durante el proceso de lavado; y (ii) estimar en condiciones controladas de casa de malla, el porcentaje de control de arvenses y su persistencia al aplicar diferentes tratamientos constituidos por los ácidos orgánicos que se forman durante la fermentación aeróbica del mucílago presente en dos tipos de sustratos de aguas residuales del beneficio del café como son las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® y las mieles del Ecomill®.

## 1. DISEÑO TEÓRICO

### 1.1 Descripción del área problemática

Desde los años sesenta tras el surgimiento y promoción masiva de la denominada “revolución verde”, los sistemas de producción agrícola a nivel mundial comenzaron a depender ampliamente del uso de semillas mejoradas y de insumos de síntesis química como garantes de la producción de alimentos. Las grandes compañías fabricantes de fertilizantes sintéticos y de agroquímicos, invirtieron enormes recursos económicos para promover la aplicación generalizada y recurrente de pesticidas para el control de plagas, enfermedades y arvenses que afectaban las cosechas, sin tener en cuenta las consecuencias negativas de este tipo de prácticas sobre los ecosistemas y sobre la salud humana.

La caficultura colombiana no estuvo ajena a esta nueva tendencia en la cual para cada problema de la finca se ofrecía una solución química. Tras el surgimiento de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) en los años 80, la aplicación de fungicidas como el oxiclورو de cobre y algunos triazoles era una práctica generalizada en todas las fincas cafeteras para el control de la enfermedad, hasta que gracias a la investigación desarrollada por Cenicafé se liberó la “variedad Colombia” cuya resistencia genética a la roya, disminuyó en gran medida la dependencia y el abuso de este tipo de agroquímicos. Posteriormente en los años 90 con la llegada al país de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) se incrementaron las aplicaciones de insecticidas altamente tóxicos como el endosulfan y el clorpirifos que afectaban negativamente tanto la salud de los ecosistemas (debido a los daños que producían sobre el suelo, el agua y la biodiversidad), como a la salud de las personas que realizaban las aplicaciones. Esta dependencia de insecticidas químicos para el control de la broca de café se ha venido disminuyendo progresivamente mediante la implementación de planes de manejo integrado que combinan prácticas culturales como el RE-RE (reparar y recoger frutos que permanezcan en los árboles y en el suelo) y la cosecha sanitaria, así como la aplicación de insecticidas biológicos compuestos por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

De igual manera la aplicación de herbicidas químicos como el glifosato, el paraquat y el glufosinato de amonio para el control de las arvenses que compiten con el cultivo del café, continúa siendo una práctica frecuente en las fincas cafeteras que afecta negativamente la salud del suelo,

la calidad del agua, la salud humana y la biodiversidad de los ecosistemas. Dichas afectaciones han llevado a muchos países importadores de café a implantar restricciones sobre el límite máximo (MRL) permitido de residuos de estos herbicidas presentes tanto en el café verde como en el café tostado. Esta condición implica replantear las agendas de investigación hacia el desarrollo de nuevos herbicidas de origen biológico también denominados “*bioherbicidas*” cuyo menor impacto para el ambiente y para las personas permita la sustitución progresiva de este grupo de pesticidas dentro de los planes de manejo integrado de las arvenses en los sistemas de producción de café en Colombia y en el mundo.

Otro factor que afecta negativamente la sostenibilidad de los sistemas de producción de café está relacionado con el manejo inadecuado de las aguas residuales que se generan durante el beneficio del café principalmente después del lavado. Estas aguas residuales también denominadas “*aguas mieles*”, poseen una gran carga contaminante debido a sus altas concentraciones de azúcares y otros compuestos orgánicos que son los constituyentes principales del mucílago que es removido mediante el lavado. En la actualidad existen varias tecnologías para el tratamiento y disposición final de las aguas residuales del café siguiendo las directrices de la normativa vigente (Resolución 1256 de 2021. Minambiente). Sin embargo, dada la naturaleza orgánica y la alta concentración de azúcares presente en este tipo de subproductos del beneficio, se considera que constituyen una fuente alternativa de materia prima con gran potencial para ser transformada y reutilizada para la producción de bioinsumos tales como los bioherbicidas que pueden ser reincorporados nuevamente en los sistemas de producción siguiendo los preceptos de la economía circular.

## **1.2 Antecedentes investigativos**

La sostenibilidad ambiental se centra en la disponibilidad continua de servicios ecosistémicos resilientes, así como en la conservación de la naturaleza. En los sistemas de producción cafetera, la sostenibilidad ambiental es una prioridad (Van der Vossen, 2005; Sachs et al., 2019) y un aspecto determinante para los programas de certificación quienes estiman la huella ambiental de los productos a lo largo del ciclo de vida mediante el modelo PEF (por su sigla en inglés, Product Environmental Footprint), con el objetivo de reducir los impactos negativos sobre el medio ambiente. Por su parte, la versión 6.3 de este modelo sugiere que, de los

agroquímicos aplicados en el café, el 90% se emite al suelo, el 9% se emite al aire y el 1% se emite al agua (Gmünder et al, 2020).

El manejo integrado de arvenses (MIA) en fincas cafeteras es una práctica que fomenta la combinación de métodos culturales, mecánicos y químicos para disminuir los procesos de interferencia y competencia de las arvenses más agresivas con el cultivo del café, que pueden afectar negativamente los rendimientos y aumentar los costos de producción (Gómez & Rivera, 1994; Rivera, 1994; Rivera, 1997a; Rivera, 1997b; Rivera, 2000; Hincapié & Salazar, 2007; Salazar & Hincapié, 2009). Desde el punto de vista económico, los costos de MIA son más significativos durante los dos primeros años del ciclo de vida del cultivo ya que representan entre el 20% y un 29% de los costos de instalación y levante; y por otro lado representan entre el 6% y el 8% de los costos en la etapa productiva del café (Duque et al., 2021).

El uso de herbicidas en los planes de manejo integrado de arvenses del cultivo del café incluye la aplicación de productos pre-emergentes como oxifluorfen en la etapa de almácigo y levante; y la aplicación en levante y producción de productos postemergentes de contacto como paraquat y glufosinato de amonio, y de productos sistémicos como el glifosato. Según la Organización Internacional del Café (OIC), existen límites máximos de residuos (MRL) de varios herbicidas que están incluidos en el *Codex alimentarius* y que restringen la comercialización de café verde y café tostado en algunos mercados. Por ejemplo, el MRL del herbicida glufosinato de amonio para mercados como la Unión Europea y Japón es de 0,10 mg/kg y para el fluazifop-p-butyl es 0,01 mg/kg (OIC, 2018). Este tipo de restricciones sumada a la salida del mercado de varios agroquímicos para el cultivo del café resalta la necesidad de investigar en herbicidas de origen natural (bioherbicidas) cuyo menor impacto ambiental no represente restricciones de uso en los sistemas de producción sostenible de café.

Las investigaciones científicas en el tema de bioherbicidas se han enfocado principalmente en aumentar el entendimiento tanto de los factores que más inciden sobre su uso exitoso, como en las tecnologías para desarrollar este tipo de bioinsumos por medios biológicos. Los principales ingredientes activos reportados por su acción bioherbicida provienen principalmente de plantas alelopáticas, aceites esenciales, compuestos fenólicos, y ácidos (Kremer, 2002; Kremer, 2005; Cai & Gu, 2016; Kremer, 2019; Schonbeck, 2019; Werrie et al., 2020; Hasan et al., 2021).

Las especies de plantas alelopáticas se caracterizan por producir compuestos bioquímicos denominados aleloquímicos que afectan el crecimiento, desarrollo, reproducción y supervivencia

de las plantas vecinas (Duke, 2010; Kostina-Bednarz et al., 2023). Este tipo de interacciones antagónicas en donde una especie vegetal suprime el crecimiento de otras plantas vecinas son atribuidas principalmente a la síntesis de diferentes compuestos como: (i) los terpenos en donde sobresalen sorgoleone, juglone, alfa y beta pineno, 1,4-cineole, 1,8-cineole,  $\alpha$  pinene, colchicina y diterpeno, los cuales son producidos por varias especies de plantas en donde se destacan los géneros *Juglans nigra*, *Amaranthus* spp., *Eucalyptus* spp., *Artemisia* spp. y *Pinus* spp.; (ii) los metabolitos secundarios como los benzoxazinoides provenientes de exudados radiculares de especies de la familia poaceae como el maíz, sorgo y el trigo (Mwendwa, 2021); y (iii) los ácidos fenólicos como la cumarina, el cineole y la escopolentina los cuales se extraen de diferentes especies de plantas como tréboles (*Melilotus* spp.), habas (*Dipteryx odorata*), canelas (*Cinnamomum aromaticum*) y barbascos (*Verbascum* spp.).

Estos compuestos botánicos aleloquímicos presentan diferentes mecanismos de acción bioherbicida en donde sobresalen la repelencia, la inhibición del crecimiento y la desnaturalización celular (Reigosa et al., 2006). Asimismo, muchos de estos compuestos son secretados por las raíces de las plantas alelopáticas o producidos durante procesos de descomposición de los residuos vegetales mediados por microorganismos cuya acción fitotóxica depende directamente de la concentración del compuesto a la que es sometida la planta afectada. El desarrollo de bioherbicidas alelopáticos se realiza generalmente en cuatro etapas: (i) extracción y purificación de los compuestos alelopáticos, (ii) identificación de los compuestos aleloquímicos más activos, (iii) determinación de los mecanismos de acción y (iv) procesamiento industrial en donde se cuantifican los efectos sobre los ecosistemas y sobre la salud humana (Kostina-Bednarz et al., 2023).

Las propiedades fitotóxicas de los aceites esenciales también han sido ampliamente documentadas y siguen siendo investigadas como una alternativa promisoriosa para el desarrollo de bioherbicidas de menor toxicidad y mayor biodegradabilidad. Los aceites esenciales de origen vegetal son compuestos extraídos de diferentes órganos de las plantas (flores, hojas, tallos, raíces, frutos y semillas) mediante procesos como destilación, hidrodestilación y expresión en frío (Werrie et al., 2020). Los aceites esenciales reportados por su acción bioherbicida están constituidos principalmente por compuestos orgánicos volátiles entre los que sobresalen: (i) los fenilpropanoides como la catequina y el cinamaldehído, y (ii) los terpenos como el limonene, el alcanfor, el mentol y el geranial.

Cuando estos compuestos volátiles son aplicados a las arvenses, interactúan inicialmente con los componentes de la cera epicuticular de sus hojas estimulando el cierre estomático lo que ocasiona una disrupción de las células guarda que posteriormente causa la desecación del tejido foliar. Adicionalmente la aplicación en mezcla de terpenos como el neral y el geranial inducen procesos oxidativos que afectan la regulación osmótica de las plantas generando síntomas de quemazón en los tejidos foliares tratados. Muchos de los aceites esenciales volátiles interrumpen el flujo de iones en los tejidos de las arvenses ocasionando daños en la membrana celular de las hojas causando la muerte de las arvenses tratadas.

Werrie, Durenne, Delaplace y Fauconnier (2020), realizaron varios estudios sobre las propiedades fitotóxicas de los aceites esenciales como una alternativa para el control de arvenses en sistemas de agricultura orgánica. En estos trabajos estudiaron los modos de acción de algunos aceites esenciales y cómo dichas sustancias inducían cambios fisiológicos en las arvenses que eran tratadas con sus extractos. Adicionalmente, describieron los procesos de translocación de estas moléculas a otros órganos de la planta, la alteración del gradiente hídrico de las células vegetales que causaban la desecación de los tejidos, la disrupción de la membrana celular y la inhibición de la fotosíntesis. Los resultados reportaron el efecto bioherbicida de algunos aceites esenciales como el aceite de trébol (*Melilotus* spp.), y el aceite de Artemisia (*Artemisia* spp.) principalmente en formulación con coadyuvantes y en mezcla con otras moléculas bioherbidas como el Juglone.

El control de arvenses con ácidos orgánicos como el ácido acético y el ácido cítrico ha sido ampliamente documentado por la literatura, dada su alta eficacia, baja toxicidad y fácil obtención a través de procesos fermentativos aeróbicos de sustratos orgánicos (Abouzienna, 2010; Chinery, 2001; Domenghini, 2020; Mahachai & Subsoontorn, 2021; Owen, 2002). Cuando estos ácidos orgánicos son aplicados a las arvenses en las concentraciones adecuadas y en los momentos oportunos, inducen procesos de oxidación de los ácidos grasos presentes en la pared celular de los tejidos foliares que causan rápidamente una desecación de las hojas similar a la obtenida al aplicar herbicidas post-emergentes de contacto, no selectivos como el paraquat y el glufosinato de amonio (Montero et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2018; Webber et al., 2012, Webber et al., 2018).

Después de una aplicación foliar de ácidos orgánicos, una fracción de estos es interceptada por el dosel de las arvenses y otra fracción cae al suelo. Fischer & Kuzyakov, (2010) demostraron que después de la aplicación del ácido acético, el 26 % fue encontrado en el suelo principalmente en la biomasa microbiana o fue adsorbido por las partículas del suelo en la forma de grupo

carboxilo (C-COOH) y el 36 % como grupo metil (C-CH<sub>3</sub>). Los microorganismos usan el C-CH<sub>3</sub> para su crecimiento, mientras los grupos C-COOH para la descarboxilación, lo que indica que el ácido acético que cae al suelo proporciona una fuente de carbono para la producción de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en el proceso de descomposición de la materia orgánica (Montero et al., 2016). Otros estudios han demostrado que la aplicación de bioherbicidas a base de ácido acético no alteran significativamente el pH del suelo a profundidades entre los 2 y 30 cm. Esta respuesta puede ser atribuida a la baja concentración de estos ácidos en la solución del suelo, a la alta degradación por parte de los microorganismos y a la capacidad amortiguadora (buffer) de la fase sólida del suelo (Jones et al., 2003; Moran & Greenberg, 2008; Montero., 2016).

Los bioherbicidas constituidos por ácidos orgánicos están siendo ampliamente utilizados en sistemas de producción sostenible de varios cultivos como un sustituto alternativo de los herbicidas sintéticos (Hasan et al., 2021). En el caso del cultivo del algodón, no se evidenciaron diferencias significativas en cuanto a rendimiento al comparar el manejo sostenible de arvenses con ácido acético al 10% contra un manejo convencional de arvenses con herbicidas químicos (Moran & Greenberg, 2008). La aplicación en pre-emergencia de ácido acético al 10% en el cultivo del maíz, no afectó el porcentaje de germinación ni el crecimiento inicial de las raíces (Pujiswanto et al., 2013). En el cultivo de la papa, la aplicación del producto Ecoclear (30% ácido acético; 1,0% solvente nafta y 1,0% trimetilbenceno) presentó porcentajes de control hasta de 97% de las arvenses que se encontraban en etapa de crecimiento activo y no afectó los rendimientos en comparación con la aplicación de herbicidas convencionales (Ivany, s. f.).

Chinery (2001), evaluó la actividad bioherbicida de amplio espectro de dos herbicidas a base de ácido acético, tres tratamientos de ácido acético comercial, un herbicida de jabón (ácido pelargónico) y un herbicida comercial sobre el control de arvenses tipo gramíneas. El estudio evaluó el efecto de los tratamientos a las 6, 24 y 72 horas y una semana después de la aplicación para determinar el porcentaje de control en función del porcentaje de cobertura observado durante los diferentes tiempos de evaluación. Los resultados muestran que todos los tratamientos controlaron las arvenses en las parcelas a las 6 horas después del tratamiento, en donde los síntomas iniciales de control incluyeron clorosis y necrosis del tejido foliar de las arvenses registrando niveles iniciales de control del 90 al 100% para todos los tratamientos de ácido acético excepto para la concentración de 5%. Owen (2002), describió el uso de ácido acético como una herramienta para el control de arvenses y analizó las directrices y regulaciones de uso de esta

sustancia para el medio ambiente y para la salud humana. El trabajo evaluó el efecto bioherbicida de diferentes concentraciones de ácido acético sobre arvenses en crecimiento activo y realizó un análisis económico de la práctica en comparación con los costos comerciales asociados al manejo integrado de arvenses en el cultivo de maíz en el estado de Iowa. Los resultados reportaron el efecto bioherbicida del ácido acético como un producto post-emergente no selectivo cuyo mecanismo de acción es similar al del paraquat, ya que causa una rápida disolución de integridad de la membrana celular que posteriormente causa una desecación de las hojas de las arvenses y muerte de las mismas.

Elmore, Spencer, Ksander y Roncoroni (2003), midieron la eficacia del ácido acético para el control de la arvense acuática (*Elodea canadensis*) y el subsecuente crecimiento de la misma al aplicar dos tratamientos bajo condiciones de campo. El estudio evaluó el porcentaje de control de esta arvense al ser sometida a diferentes concentraciones de ácido acético diluido y estimó los porcentajes de control obtenidos en función de los cambios en la biomasa registrada en cada uno de los tratamientos en comparación con el testigo absoluto. Los resultados confirmaron una susceptibilidad diferencial de las plantas acuáticas a las diferentes soluciones de ácido acético lo que sugiere la posibilidad de incluirlo en los canales y sistemas de irrigación en donde la presencia de este tipo de plantas acuáticas limita la eficiencia en la distribución del agua de riego.

Rahayuningsih y Supriadi (2005), determinaron la efectividad de una fórmula a base de ácido acético para el control de arvenses de hojas anchas en campos comerciales de plantas medicinales, para lo cual evaluaron dos formulaciones de ácido acético en mezcla con sales y ácido cítrico, además evaluaron un testigo comercial a base de ácido diclorofenoxiacético. Los parámetros evaluados en este estudio fueron el porcentaje de mortalidad de arvenses, la resurgencia de las arvenses y el peso seco de arvenses cortadas. Los resultados indican que los tratamientos de ácido acético en mezcla con sal, ácido cítrico y ácido acético de madera al 15% fueron efectivos para el control de arvenses de hojas anchas, indicando un mecanismo de acción por contacto que deseca las arvenses debido al rompimiento de la membrana celular de sus hojas.

Anderson (2007), estudió el control de rizomas de la arvense *Spartina alterniflora* mediante la utilización de diferentes concentraciones de bioherbicidas a base de ácido acético examinó su efecto bioherbicida en concentraciones de 0,1, 1,0 y 1,5% sobre el control de esta arvense acuática, en donde el porcentaje de control se monitoreó durante tres tiempos después de la aplicación midiendo la conductividad eléctrica del agua sola y con los diferentes tratamientos

de ácido acético, así como la integridad de la membrana celular de los propágulos tratados para cuantificar el porcentaje de control. Los resultados reportaron que la exposición de las plantas tratadas por cuatro horas a todas las concentraciones de ácido acético redujo la frecuencia de producción de inflorescencias de las plantas, condición que disminuyó el potencial de dispersión de esta especie de arvense invasora.

Abouziena, Omar, Sharma y Shingh (2009), resaltaron la necesidad de acelerar el desarrollo y la implementación de herbicidas efectivos de naturaleza orgánica que sean seguros para el medio ambiente, satisfagan las necesidades de los productores y den respuesta a una demanda creciente de los consumidores por productos orgánicos. Para lograr este objetivo, evaluaron en invernadero la efectividad de tres concentraciones de ácido acético, tres concentraciones de ácido cítrico y un compuesto a base de gluten de maíz sobre el porcentaje de control en pre y post-emergencia de varias especies de arvenses gramíneas y hojas anchas. Para estimar dicha efectividad realizaron mediciones de la mortalidad de las arvenses en periodos de cinco semanas después de la aplicación de los tratamientos indicando que el tratamiento más efectivo para el control de arvenses fue el ácido acético al 30% en post-emergencia y el gluten de maíz en pre-emergencia, además reportaron que las aplicaciones que se realizaron cuando las arvenses presentaban más de seis hojas redujeron la eficacia de los controles.

Snell (2012), examinó la eficacia y los costos de cinco alternativas físicas y químicas para el control de especies de arvenses gramíneas y hojas anchas, en donde una de las alternativas orgánicas incluyó la evaluación del porcentaje de control de un producto a base de ácido acético al 20%. El estudio evaluó cinco tratamientos (labranza, herbicida orgánico a base de ácido acético al 20%, quema física, solarización y cultivos de cobertura) y un testigo absoluto. Durante este estudio se colectaron datos del porcentaje de cobertura de las arvenses en las parcelas usando cuadrantes de 1 m<sup>2</sup> a los 38 días después de la aplicación de los tratamientos. Los resultados informan que los tratamientos de control físico fueron más efectivos que los de control químico, indicando una mayor persistencia del control cuando las arvenses eran removidas mecánicamente. En general las especies gramíneas presentaron un menor porcentaje de control y los costos de las diferentes alternativas de control fueron muy variables debido a los métodos de implementación y al equipo utilizado.

Hasan, Ahmad-Hamdani, Rosli y Hamdan (2021), presentan un estado del arte sobre algunos bioherbicidas que se encuentran actualmente en el mercado, el impacto de su uso sobre la

fisiología de las arvenses y los factores potenciales que influyen la eficacia de estos productos. Esta investigación presenta los mecanismos de acción de diferentes bioherbicidas y sus efectos sobre la germinación y crecimiento de las arvenses, adicionalmente detalló el impacto fitotóxico de su acción sobre los procesos celulares de las arvenses. Los autores reportaron que los cambios fisiológicos más frecuentes de la acción bioherbicida incluyen cambios en la integridad de la membrana celular, disminución en la tasa de división celular, alteración en los procesos de la absorción de nutrientes y promoción de cambios hormonales que afectan el crecimiento y el desarrollo de las arvenses tratadas.

Por su parte Silva, Brigatti, Santos y Mecina (2013), evaluaron el potencial alelopático de la pulpa de café fresca y seca y sus efectos para el control en post-emergencia de algunas arvenses del cultivo del café. El trabajo comparó el efecto de extractos bioherbicidas obtenidos a partir de la pulpa de café fresca y seca utilizando dos especies testigo como son la lechuga y el repollo de malasia sembrados en las calles de cafetales en etapa de levante. Los tratamientos fueron aplicados en etapa de pre-emergencia y post-emergencia de las arvenses e indicaron una acción positiva de los extractos de pulpa tanto fresca como seca para el control de arvenses principalmente atribuido a cambios en el pH y en la conductividad eléctrica de la superficie de las hojas de las arvenses tratadas en post emergencia.

Pujisiswanto, Yudono, Sulistyaningsih y Sunarminto (2013), determinaron para el caso del cultivo del maíz, el efecto del ácido acético en pre-siembra sobre la germinación, crecimiento de plántulas y efecto tóxico sobre maíz. El estudio evaluó el efecto de la concentración de ácido acético (0, 10 y 20%) y la época de aplicación (4, 8, 12 días después de siembra) sobre el crecimiento y desarrollo del maíz en condiciones experimentales. Los resultados mostraron que el ácido acético presentó controles de arvenses entre el 24 y el 67% y ninguno de los tratamientos inhibió la germinación del maíz ni el crecimiento de las raíces del maíz.

Webber, White Jr, Shrefler y Spaunhorst (2018), determinaron la influencia de la concentración de ácido acético, el volumen de aplicación y la adición de coadyuvantes sobre la eficacia en el control de arvenses, después de los tratamientos se estimó visualmente la cobertura de las arvenses y los porcentajes de control a los cuatro días después de la aplicación. Los resultados indicaron que el tratamiento con ácido acético fue más efectivo para el control de arvenses de hoja ancha y menos efectivo para el control de especies gramíneas, y que el porcentaje

de control también fue mayor al aumentar la concentración de ácido acético y los volúmenes de aplicación.

Domenghini (2020), comparó la supresión de arvenses con glifosato en comparación con tres concentraciones de ácido acético en dos momentos de aplicación, en donde inicialmente se estimaron los porcentajes de control en función de una calificación visual de la cobertura de arvenses en diferentes tiempos después de la aplicación de los tratamientos. Los resultados mostraron que el tratamiento con glifosato resultó más efectivo en cuanto al porcentaje de control obtenido; sin embargo, los tratamientos con las tres concentraciones de ácido acético (5, 20, 30%) también representan alternativas viables para el control de las arvenses evaluadas.

Mahachai y Subsoontorn (2020), evaluaron el efecto bioherbicida de tres diferentes preparaciones a base ácido acético sobre el control de malezas tropicales, y cuantificaron la efectividad de un sustituto orgánico a base de extractos vegetales como adyuvante de uno de los tratamientos. El trabajo evaluó en invernadero el efecto bioherbicida de tres tratamientos a base de ácido acético solo y en mezcla con sales y jabón. Como una alternativa orgánica al uso de jabón industrial utilizaron extractos de cerezas como sustitutos. Los resultados indican que el ácido acético al 10% en mezcla de peróxido de hidrógeno al 10% y con jabón al 0,2 % eliminaron la gran mayoría de las arvenses evaluadas, mientras que al sustituir el jabón industrial por el extracto de cereza se obtuvo un buen control de arvenses de hojas ancha pero hubo escape de algunas gramíneas.

En el caso particular del café, el mucílago y las aguas mieles provenientes del beneficio son subproductos orgánicos ricos en azúcares y sustancias pécticas que, al ser sometidos a procesos de fermentación aeróbica, constituyen un sustrato para la producción de ácidos orgánicos volátiles como el ácido acético y no volátiles como el ácido cítrico (Rodríguez- Valencia, 2009). A medida que aumenta el tiempo de fermentación, también aumenta la acidez total entendida como la medida del contenido de sustancias ácidas presentes en el mucílago del café. En estudios realizados en Cenicafé, la acidez titulable total de un litro de mucílago de café fresco (sin fermentar) que presentó un valor promedio de 969 mg de  $\text{CaCO}_3$ , aumentó con el tiempo de fermentación, triplicando su valor a las 20 horas y alcanzando un valor promedio 7.156 mg de  $\text{CaCO}_3$  a las 74 horas y a temperatura ambiente (Inés Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011). Otros estudios también reportan un aumento significativo de las concentraciones de ácido acético y ácido cítrico presentes en el mucílago del café y en aguas de beneficio a medida que aumentan los tiempos de

fermentación (Palma y González, 1989; Jackels & Jackels, 2005). Al analizar aguas de despulpado de café utilizando un volumen de 4,5 litros de agua por kilogramo de café pergamino seco (cps), se encontró un aumento de la concentración inicial de ácido cítrico de 2.511 ppm a una concentración final de 7.440 ppm a las 60 horas de fermentación; así mismo el ácido acético aumentó su concentración de 212 ppm a 708 ppm en 60 horas de fermentación (Palma y González, 1989).

La concentración de los ácidos orgánicos presentes tanto en el mucílago del café como en las aguas residuales provenientes del beneficio puede variar en función de factores como la madurez de los granos cosechados, la temperatura y los microorganismos que producen las enzimas responsables de fermentación (Puerta y Ríos, 2011; Puerta et al., 2012). Dentro de los microorganismos involucrados en la producción de ácido acético se encuentran las bacterias aeróbicas *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter* spp., *Gluconacetobacter* spp. y *Enterobacter* spp.; mientras que el ácido cítrico es producido por hongos como *Aspergillus niger* y levaduras como *Candida* spp. (Behera et al., 2021; Guillamón & Mas, 2011).

A nivel industrial el ácido acético puede ser extraído mediante tres procesos: (i) oxidación aeróbica de acetaldehído, (ii) oxidación de butano y (iii) por oxidación de alcohol etílico (Guillamón y Mas, 2011). Este último proceso es especialmente atractivo para la producción industrial de un bioherbicida a base de ácido acético obtenido del mucílago de café, ya que según datos de Cenicafé por cada kilogramo de mucílago sin diluir se pueden producir 57,9 mililitros de etanol al 98,6% (Rodríguez y Zambrano, 2011). Lo que constituye una fuente potencial de materia prima para la fabricación a escala industrial de bioherbicidas de naturaleza orgánica producidos mediante procesos oxidativos de etanol obtenido de mucílago de café.

### **1.3 Justificación de la investigación**

Las investigaciones sobre tecnologías sostenibles realizadas mediante el enfoque de los sistemas biológicos integrados también conocidos como “Biosistemas Integrados”, parten de la necesidad de solucionar problemas reales a través de procesos en donde los subproductos o residuos contaminantes son transformados en nuevos productos o materias primas ecoeficientes. Dicha funcionalidad está a su vez fundamentada en el redireccionamiento de las salidas de los sistemas de producción mediante procesos cíclicos y no lineales, en donde los residuos se

---

aprovechan y se reincorporan nuevamente al sistema, permitiendo que los flujos de materia y energía derivada de los subproductos sean optimizados para aumentar la eficiencia en los procesos de conversión biológica (Holden, 2020).

Las contribuciones de los Biosistemas Integrados a la sostenibilidad económica incluyen la disminución de los costos asociados al manejo de residuos, así como la creación de nuevas oportunidades para la diversificación del ingreso en las economías locales, de igual forma sus aportes a la sostenibilidad social involucran la generación de nuevos puestos de trabajo, el fortalecimiento de capacidades, el emprendimiento y el empoderamiento de las comunidades. Mientras en lo que respecta a la sostenibilidad ambiental, los biosistemas integrados promueven la transformación de subproductos y residuos en materias primas útiles a través de procesos biológicos reduciendo la contaminación y sus impactos negativos sobre los ecosistemas y sobre la salud de las personas (McNeill et al., 2005; Patrick et al., 2004).

Los sistemas de producción de café en Colombia representados por más de 650.000 fincas que cultivan el grano en un área cercana a 840.000 hectáreas, no solo producen anualmente entre 12 y 14 millones de sacos de 60 kilogramos de café verde tipo exportación; además generan enormes volúmenes de subproductos del beneficio como la pulpa y el mucílago presente en las aguas residuales del lavado del café que en caso de no ser dispuestos y aprovechados correctamente constituyen una fuente de contaminación para los suelos, el aire y los cuerpos de agua como ríos y quebradas. Adicionalmente los agroquímicos y fertilizantes utilizados durante el proceso productivo del café, constituyen otra fuente de contaminación ambiental que afecta negativamente a los ecosistemas y a la salud humana.

En este contexto, la pertinencia y relevancia del presente trabajo de investigación, están fundamentadas en la evaluación hasta un TRL 5 (Nivel de Madurez Tecnológica Intermedia) de nuevos productos de origen orgánico para el control de las arvenses derivados de las aguas residuales del beneficio del café, como una alternativa para la sustitución parcial de algunos herbicidas químicos frecuentemente usados en fincas cafeteras (MinCiencias, 2016). Adicionalmente, la investigación aporta a la generación de nuevo conocimiento sobre el potencial de los bioinsumos como una estrategia para alcanzar la sostenibilidad económica, social y ambiental de los sistemas de producción cafetera siguiendo los preceptos de la economía circular. Conceptualmente la economía circular ha sido definida como un sistema de producción y consumo que promueve la eficiencia en el uso de materiales, el agua y la energía; teniendo en cuenta la

---

capacidad de recuperación de los ecosistemas y el uso circular de los flujos de materiales a través de la implementación de innovaciones tecnológicas, alianzas y colaboraciones entre actores, y el impulso de modelos de negocio que respondan a los fundamentos del desarrollo sostenible (DANE, 2020).

## **1.4 Objetivo General**

Evaluar el efecto bioherbicida de los ácidos orgánicos que se producen durante la fermentación del mucílago presente en las aguas residuales del lavado del café, como una alternativa sostenible para el control de arvenses.

### **1.4.1 Objetivos específicos**

- Caracterizar física, química y microbiológicamente los sustratos de aguas residuales provenientes del lavado del café (mieles de Ecomill® y aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®) y sometidos a fermentación aeróbica prolongada.
- Identificar la dinámica de producción de ácidos orgánicos en los sustratos evaluados.
- Determinar el porcentaje y persistencia del control de arvenses de los sustratos evaluados, en condiciones controladas de casa malla.

## **1.5 Categorías de análisis**

### **1.5.1 Hipótesis**

Con al menos uno de los tratamientos provenientes de las aguas residuales del café, se alcanza un porcentaje de control de arvenses en crecimiento activo, superior al 70% y una persistencia del control superior a 15 días frente al testigo absoluto (sin aplicación).

## 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.1 La bioeconomía: una alternativa para aumentar la sostenibilidad de los sistemas de producción de café en Colombia

Según la Misión de Sabios de Colombia (2019), la bioeconomía entendida como el aprovechamiento sostenible del capital natural representa una alternativa con gran potencial para la generación de valor en diferentes sectores productivos, mediante la implementación y puesta en marcha de modelos de producción de bienes y servicios obtenidos a partir de la biodiversidad. En la actualidad, la caficultura colombiana enfrenta enormes desafíos relacionados con la sostenibilidad que en gran medida pueden enfrentarse mediante una transformación estructural de los actuales modelos de producción fundamentada en la bioeconomía. Para lograr una transición exitosa, el modelo propuesto debe garantizar la viabilidad económica, social y ambiental; lo cual implica definir una apuesta institucional que destine los recursos suficientes para la formulación de una estrategia bioeconómica para el subsector cafetero. Más allá de aportar a la competitividad del sector mediante un aumento progresivo de la productividad de los sistemas de producción y de la calidad del café, una estrategia bioeconómica implica la adopción de cambios en las agendas de investigación, el fortalecimiento de capacidades y la búsqueda continua de oportunidades de innovación en temas como agricultura regenerativa, producción y consumo responsable, economía circular, energías limpias, así como en los bioinsumos que constituyen el núcleo temático del presente trabajo de investigación.

Tradicionalmente, el problema de la alta dependencia de las fincas cafeteras a utilizar agroquímicos dentro de los planes de manejo integrado de arvenses, plagas y enfermedades, llevó a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia a iniciar desde hace algunos años, diversos programas de investigación sobre alternativas biológicas que disminuyeran los impactos negativos derivados de la utilización de insumos químicos en los sistemas de producción de café. De esta manera se empezaron a promover actividades como el compostaje de residuos orgánicos y de subproductos como la pulpa del café como una alternativa para sustituir parcialmente los fertilizantes químicos. Adicionalmente, se iniciaron fuertes campañas para utilizar hongos entomopatógenos para el control de la broca del café. En este contexto, los bioinsumos retomaron

su importancia como alternativas sostenibles para minimizar el uso de pesticidas que presentan actualmente restricciones de uso en los sistemas de producción cafetera.

### ***Los bioinsumos como estrategia para el desarrollo de la bioeconomía en el sector agrícola***

Según el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) en 2020, los bioinsumos son todos aquellos productos constituidos de organismos vivos tales como microorganismos (hongos, bacterias, virus, etc.) o sus derivados, macroorganismos (ácaros e insectos benéficos), extractos de plantas y sus compuestos de origen biológico o natural y que son destinados a ser aplicados como insumos en la producción agropecuaria. Este tipo de soluciones basadas en la naturaleza (SBN) comprenden tres categorías de productos: productos de control biológico (biocontroladores y agentes fitosanitarios, ya sean de origen fúngico, viral, bacteriano, vegetal o animal, o derivados de estos), biofertilizantes, y bioestimulantes o fitorreguladores. En el caso particular de los bioherbicidas se incluyen dentro de la categoría de biocontroladores.

En el ámbito político, en diciembre de 2021, el Senado de la República de Colombia presentó un informe de ponencia para el segundo debate sobre el proyecto de ley número 232 de 2021 mediante el cual se constituye el Sistema Nacional de Insumos Agropecuarios (SINIA), en donde se establece la Política Nacional de Insumos Agropecuarios y se crea el Fondo de Acceso a los Insumos Agropecuarios (FAIA). Este proyecto de ley tiene como objetivo aumentar la efectividad de las medidas relacionadas con los insumos agropecuarios debido a su impacto directo sobre la productividad, competitividad y sostenibilidad de las actividades agropecuarias, y por tanto en la fijación de precios de los alimentos. El SINIA tiene dentro de sus objetivos promover un uso más racional y sostenible de los insumos agropecuarios para el mejoramiento de las condiciones de vida de los productores agropecuarios y de la calidad del medio ambiente. La política tiene un énfasis en la producción y utilización de bioinsumos, entendidos como productos orgánicos de naturaleza biológica que pueden reemplazar los pesticidas químicos que contaminan actualmente los ecosistemas naturales. Ante este panorama, se evidencia una tendencia actual hacia la generación de iniciativas que propicien procesos de investigación, desarrollo, promoción y utilización de los bioinsumos como una alternativa bioeconómica dirigida a aumentar la sostenibilidad de los sistemas de producción agropecuaria en el país.

Después de tener una visión más amplia de la problemática, las necesidades y la normativa en torno a los bioinsumos, surgió la siguiente pregunta: ¿cómo se puede avanzar en la transformación

de la caficultura desde los planteamientos de la bioeconomía?. Un punto de partida puede ser el levantamiento de estudios de líneas base que contengan una valoración detallada de la naturaleza y composición de todos los insumos empleados en la producción cafetera para posteriormente clasificar dichos insumos en función de su semejanza compositiva que constituya el punto de partida de una búsqueda exhaustiva de sustitutos de naturaleza orgánica o microbiológica que puedan ser obtenidos por medios biotecnológicos que utilicen como materia prima algunos recursos propios del sistema tales como subproductos, microorganismos o recursos biomásicos. Adicionalmente, la producción de bioinsumos tales como biofungicidas, biopesticidas y biofertilizantes requeridos por la caficultura constituye una gran oportunidad para la creación de nuevos emprendimientos tales como biofábricas que representen una fuente potencial de ingresos, lo cual requiere de procesos de apalancamiento, financiación y fomento a través de mecanismos como beneficios tributarios y asignación de fondos para proyectos piloto. Los mayores beneficios obtenidos a partir de una transición del sector cafetero hacia un modelo sostenible fundamentado en la bioeconomía circular incluyen la disminución de la huella ecológica del proceso productivo, la protección a la biodiversidad, la reducción de la contaminación de suelos y aguas, el aprovechamiento de los subproductos y de energías limpias así como importantes avances en la mitigación y adaptación al cambio climático.

## **2.2 Las aguas residuales del café: un contaminante con un alto potencial para la producción de bioinsumos para la caficultura colombiana**

El agua limpia es un elemento ampliamente usado en el proceso de beneficio del café el cual comienza después de que las cerezas son cosechadas. Anteriormente el agua se utilizaba en diversos procesos del beneficio como el transporte del café cereza a través de cafeductos, el despulpado húmedo, la clasificación hidráulica, el lavado del café en canales de correteo y el transporte del pergamino húmedo; operaciones que representaban un uso excesivo del recurso hídrico generando grandes volúmenes de aguas residuales contaminantes. Con el objetivo de promover la conservación, el cuidado y el uso eficiente del recurso hídrico en las fincas cafeteras, Cenicafé ha desarrollado tecnologías encaminadas a disminuir el consumo de agua y por ende la cantidad de aguas residuales generadas durante la poscosecha del café. Con el desarrollo a finales de los años 90 del “Beneficio Ecológico” se promovió la utilización del agua limpia solamente

para el lavado del café, lo que implicaba hacer cambios estructurales en los beneficiaderos tradicionales tales como: (i) la sustitución el transporte de café cereza con agua a través del café de cafeductos por un transporte que utilizaba la gravedad o sistemas mecánicos como tornillos sin fin, (ii) el despulpado sin agua y (iii) la utilización del desmucilaginador mecánico Becolsub. Este tipo de tecnologías permitieron disminuir el consumo de agua limpia durante el beneficio de 40 L/kg cps seco a menos de 1,5 L/kg cps; disminuyendo además la cantidad de agua residuales emitidas por las fincas cafeteras. Posteriormente, Cenicafe desarrolló la tecnología Ecomill® para el lavado del café, la cual representaba una alternativa para reducir a menos de 0,7 L/kg cps en comparación con el sistema de lavado Tanque Tina®, cuya técnica de los cuatro enjuagues requiere 4,17 L/kg cps (Rodríguez, Oliveros, Sanz y Ramírez, 2015).

### *Características de las aguas residuales provenientes del lavado del café*

Las aguas residuales provenientes del lavado del café se componen principalmente de residuos de pulpa y mucílago en descomposición. El mucílago del café es un tejido esponjoso proveniente del mesocarpio de aproximadamente 0,5 mm de espesor que representa alrededor del 14,85% del peso del fruto en base húmeda (Montilla, 2008). En cuanto a su composición, el mucílago se compone principalmente por sólidos como azúcares y pectinas, de los cuales el 15% de dichos sólidos se presentan en la forma de un hidrogel coloidal insoluble en agua, constituidos en un 80% por ácidos pécticos y 20% por azúcares. El potencial contaminante de las aguas residuales del café está estrechamente relacionado con la alta carga orgánica del mucílago en descomposición el cual es retirado del pergamino mediante el lavado con agua limpia una vez concluye el proceso de fermentación espontánea. Zambrano & Isaza (1994) demostraron que durante el proceso de lavado del café realizando la técnica de cuatro enjuagues, el 89,2% de la contaminación total acumulada provenía del mucílago retirado del pergamino, mientras que la contaminación restante provenía de residuos de pulpa y otros tipos de material orgánico presentes en la masa de café. Zambrano & Isaza (1998) reportaron que el potencial contaminante de cada kilogramo de café cereza procesado mediante beneficio húmedo, corresponde a 30,27 g de DQO por kilogramo de cereza. Posteriormente, las investigaciones adelantadas por Rodríguez (2009), reportan que al retirar el mucílago del café después de una fermentación natural mediante la técnica de cuatro enjuagues, se generan de 4 a 5 litros de agua residual por cada kilogramo de café pergamino seco, que originan una carga orgánica contaminante cercana a las 27.000 partes por millón (ppm) de DQO, mientras

---

que al utilizar el sistema de desmucilaginado mecánico Becolsub solo se producen entre 0,5 y 0,6 litros de agua residual por kilogramo de cps con una carga orgánica cercana a 110.000 ppm de DQO.

El potencial de contaminación de las aguas residuales provenientes del lavado del café depende directamente de los contenidos de contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en dichas aguas, los cuales dependen a su vez de factores relacionados con la variedad de café cosechada, el índice de madurez de la masa de café cereza procesada, el tipo de beneficiadero, así como de la cantidad y calidad del agua utilizada durante el proceso de beneficio. Desde el punto de vista de los contaminantes de origen microbiológico, los principales microorganismos reportados en las aguas residuales del café corresponden principalmente a los grupos aeróbicos mesófilos, coliformes totales y fecales, estreptococos, enterococos, mohos, levaduras y algunos patógenos como *Clostridium perfringens*, *Shigella* sp. y *Salmonella* sp. Los agentes contaminantes de origen orgánico corresponden principalmente a azúcares, ácidos orgánicos y grupos carboxílicos que se producen durante procesos fermentativos del mucílago y de residuos de pulpa presentes en la masa de café, este tipo de contaminación se relaciona directamente con medidas analíticas como la Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos Totales (ST), Sólidos Disueltos (SD) y Sólidos Suspendidos Totales (SST). Desde el punto de vista de las principales fuentes de contaminación inorgánica, los metales pesados y otros elementos minerales presentes en las aguas de lavado pueden ser contaminantes cuyas concentraciones dependen a su vez de las características particulares de calidad física de la fuente de agua. Los estudios de Zuluaga et al., (1991) concluyeron que las aguas residuales del beneficio son de naturaleza ácida, esto fue confirmado por los estudios de Centanaro y Gutiérrez (1991) quienes reportaron que las aguas residuales provenientes del lavado del café generaban una acidez total de 0,67 meq/100g a las 24 horas después de haber sido generadas, en donde el 76% correspondía a la acidez fija y el 24% a la acidez volátil, compuesta principalmente por los ácidos galacturónico, oxálico, malónico, acético, cítrico y láctico. De igual manera Rodríguez (1999) reportó para las aguas residuales del lavado una relación DQO/DBO<sub>5</sub> de 1,75. La Tabla 1 elaborada por Rodríguez (1999) presenta las principales características químicas de las aguas residuales provenientes del lavado del café.

Tabla 1. Principales características químicas de las aguas residuales provenientes del beneficio del café (Fuente: Rodríguez, 1999).

Parámetro	Muestras				Promedio
	1	2	3	4	
pH (Unidades)	3,71	3,72	3,71	3,70	3,71
DQO Total (ppm)	10220,0	9160,0	9800,0	11100,0	10070,0
DQO Filtrada (ppm)	7250,0	6770,0	7000,0	7550,0	7143,0
DBO <sub>5</sub> (ppm)	3900,0	3900,0	4500,0	3200,0	3875,0
N-NTK (ppm)	219,0	219,0	224,0	211,0	218,25
N-NNH <sub>3</sub> (ppm)	9,66	9,7	9,44	9,24	9,51
ST (ppm)	4696,0	2292,0	2202,0	2082,0	2818,0
SST (ppm)	1488,0	1876,0	1728,0	1120,0	1553,0
P-PO <sub>4</sub> (ppm)	0,00	0,02	0,00	0,00	0,005
S-SO <sub>4</sub> (ppm)	28,0	33,0	30,0	27,0	29,5
N-NO <sub>3</sub> (ppm)	0,80	0,80	0,90	0,40	0,73
Acidez (ppm)	790,0	790,0	860,0	850,0	823,0

### *Tecnologías para el tratamiento de las aguas residuales provenientes del lavado del café*

Debido a su alto potencial contaminante, las aguas residuales del beneficio del café deben ser manejadas y dispuestas de forma apropiada, siguiendo los lineamientos de la normativa vigente para no convertirse en vertimientos que ocasionen daños a los ecosistemas. Las alternativas más utilizadas por los caficultores para tratar las aguas residuales del café son: (i) Sistemas Modulares de Tratamiento Anaeróbico de Aguas residuales (SMTA), (ii) tratamientos químicos, (iii) tratamientos con extractos vegetales y (iv) filtros verdes.

Los SMTA son sistemas que logran remover la contaminación de las aguas residuales hasta en un 80% y consisten en una secuencia de cuatro tanques por donde fluyen las aguas contaminadas por gravedad mediante un desnivel mínimo entre tanque y tanque de 75 cm. Cenicafé recomienda que las aguas de primera y segunda cabeza de lavado deben asperjarse sobre la pulpa del café en los procesadores de pulpa techados en donde se mezclan con otras fuentes de materia orgánica y con cal con el objetivo de propiciar un proceso de deshidratación que no genere contaminación. Estas aguas nunca pueden ser vertidas a las fuentes hídricas ya que contienen una alta proporción del mucílago removido por el lavado, constituyendo un lixiviado de alto poder contaminante. Por su parte las aguas de tercera y cuarta cabeza de lavado son las que se dirigen al SMTA, en donde

pasan primero por una *trampa de pulpa* que captura los residuos de la pulpa y del café molido por la despulpadora. Posteriormente estas aguas pasan a un segundo tanque denominado *Reactor Hidrolítico Acidogénico* en donde se almacenan durante 48 horas con el propósito de decantar los sedimentos y lodos que luego deben ser dispuestos en el procesador de pulpa, en este sistema no se puede generar turbulencia para que haya una buena separación por densidad de los sólidos y de los líquidos presentes. El tercer tanque del sistema modular se denomina *Recámara dosificadora* y se utiliza para dosificar el caudal que ingresa a la siguiente fase del sistema. Esta recámara está constituida por un flotador, una malla, un dron de tubos perforados y gravilla, que constituyen una trampa de sólidos que actúa como un filtro que evita taponamientos del sistema. El cuarto y último tanque es el *Reactor metanogénico* que es el sitio en donde se procesa el agua que contiene los sólidos solubles, este proceso requiere una previa la inoculación del agua con microorganismos que son finalmente quienes realizan la depuración de la contaminación por carga orgánica hasta reducir la contaminación en un 80%. Es importante señalar que para mantener viva la cepa de estos microorganismos se recomienda agregar una mezcla de estiércol, urea, cal masilla y miel de purga, teniendo en cuenta que no se recomienda hacerle mantenimiento para no destruir la biopelícula en la cual se establece la cepa microbiológica (Rodríguez-Valencia et al., 2019).

El tratamiento químico de las aguas residuales del café se realiza generalmente mediante adiciones de cal apagada en dosis de 3 a 5 kg por m<sup>3</sup> de agua residual con el propósito de eliminar más del 50% de la contaminación orgánica y el 75% de los sólidos suspendidos. También se pueden adicionar sales de hierro y aluminio ya que sus cationes atraen las partículas aniónicas libres presentes en los efluentes y las flocula para que se sedimenten por gravedad. El sulfato de aluminio [AL<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>], es el químico más usado para la coagulación química de aguas residuales sin embargo el uso de este producto implica altos riesgos para la salud humana ya que se acumula en las células cerebrales y existen reportes de que puede causar enfermedades degenerativas del sistema nervioso como el Alzheimer.

El tratamiento biológico de aguas residuales con extractos de plantas involucra el uso de extractos de semillas de Moringa (*Moringa oleífera*) utilizados como coagulantes para clarificar el agua turbia, incluso algunas personas utilizan este extracto como potabilizador de aguas ya que los sólidos solubles se reducen en 24 horas, ofreciendo un tratamiento similar al obtenido con sales de aluminio (Garde et al., 2017). La dosis recomendada para este tratamiento varía entre 5 a 6 gramos de extracto de semillas de Moringa para tratar un litro de agua contaminada. Estos extractos

reducen los sólidos solubles totales, la demanda química de oxígeno (DQO), los nitratos y los nitritos en dependencia del pH de la solución y de la dosis aplicada. Otros extractos utilizan semillas de higuera (*Ricinus communis*) que purifican el agua mediante la producción de la proteína lectina cuyo efecto coagulante remueve los sólidos solubles y disminuye de la DQO debido a la naturaleza catiónica de la proteína. Otra especie promisorio para el tratamiento de aguas residuales es la *Jatropha* (*Jatropha curcans*), que es una oleaginosa que purifica las aguas de una manera similar a la de la higuera (Rodríguez, 2009).

Los filtros verdes son una tecnología recientemente desarrollada por Cenicafé para el manejo de la contaminación de las aguas de beneficio del café sin generar vertimientos. Estos filtros se construyen en el suelo mediante la excavación de una fosa recubierta con geomembrana y rellena con suelo sobre la cual se siembran especies gramíneas como el pasto Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), posteriormente se instala un sistema de riego por goteo que utiliza tubería perforada para distribuir las aguas residuales de tercera y cuarta cabeza de lavado que son absorbidas por las plantas de vetiver y depuradas mediante evapotranspiración, generando la liberación a la atmósfera del agua totalmente limpia. Este potencial evapotranspirativo puede aumentarse mediante la instalación de una cubierta plástica tipo invernadero sobre el filtro verde que aumente la temperatura al interior del sistema, aumentando por ende la tasa evapotranspirativa (Rodríguez, 2009)

Otros métodos alternativos de tratamiento de aguas residuales del café involucran el uso de microorganismos como bacterias y levaduras que purifican el agua mediante reacciones anaeróbicas. Ferreira et al., (2021) evaluaron la efectividad del tratamiento de aguas residuales del café utilizando la aplicación de un inóculo de los microorganismos con base en *Serratia marcescens*, *Corynebacterium flavescens* y *Acetobacter indonesiensis* que disminuyeron la DBO hasta en un 85% y propiciaron reducciones hasta del 60% de la DQO. Adicionalmente estos microorganismos redujeron los contenidos de fósforo y de nitrógeno en un 80%, incrementando el pH del agua de 6,0 a 7,5. Este tipo de depuración de aguas residuales con el uso de microorganismos se produce debido a ciertas propiedades de degradación metabólica vía microbiana que favorecen tanto la conversión de compuestos orgánicos complejos a compuestos simples, como a la remoción en el agua de algunos compuestos de bajo peso molecular. Las bacterias han sido muy usadas para el tratamiento de aguas contaminadas debido a su amplia abundancia y capacidad de adaptación a variaciones ambientales como la temperatura y bajos niveles de oxígeno. Este consorcio bacteriano

aislado del proceso del café redujo en los efluentes el 67% de sólidos suspendidos, 62,27% de pectina, 27,4% de taninos, 63,52 % de celulosa y el 60% de la hemicelulosa en condiciones anaeróbicas. La bacteria *Corynebacterium* sp., también ha sido reportada por su potencial de biodegradación de pesticidas organofosforados, así mismo *Serratia* sp., *Corynebacterium* y *Bacillus subtilis* producen biofloculantes que tienen el potencial de remover solidos suspendidos en el agua y algunos metales pesados. Otras bacterias como *Acetobacter*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces* han sido utilizadas para el tratamiento de aguas dado su alto potencial metabólico y capacidad de oxidación de azúcares y alcoholes.

Ashenafi et al. (2021), estudiaron la efectividad de tratamientos formulados con base en un cultivo mixto de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli* que degradó contaminantes orgánicos con poco efecto residual para los ecosistemas acuáticos en donde su efectividad fue cuantificada por reducciones en los efluentes de la demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno y sólidos totales; determinaciones relevantes al momento de elegir el método microbiológico de tratamiento de agua más adecuado. Estos microorganismos requieren condiciones y tiempos específicos para adaptarse al medio en el cual crecen ya que medida que aumentan los tiempos de fermentación también se reducen la DQO, DBO y ST. Por su parte Ancy et al. (2020) evaluaron cepas de *Enterobacter* sp. y *Bacillus cereus* para el tratamiento de aguas con contaminantes orgánicos como carbohidratos, fibras, polifenoles, pectinas, proteínas y nutrientes como nitratos y fosfatos, encontrando que estos microorganismos actúan como biofloculantes que producen enzimas hidrolíticas como celulasas, pectinasas y xilanasas que promueven la degradación de estos contaminantes tóxicos mediante procesos biológicos.

Según la normativa vigente relacionada con el manejo sostenible de las aguas residuales del café está prohibido cualquier tipo de vertimiento a las fuentes hídricas o al suelo. El Decreto 50 del 2018, dicta que para realizar una descarga de la aguas residuales tratadas al suelo, se requiere realizar previamente una caracterización fisicoquímica y microbiológica de dichas aguas, condición que implica un alto costo para un caficultor pequeño o mediano que puede incidir negativamente en la rentabilidad de su empresa cafetera. Teniendo presente que el agua limpia es un requisito para obtener un café de buena calidad la Resolución 2115 de 2007 establece las características de calidad que debe tener el agua, ya que es un bien de uso público en donde su conservación y uso prioritario es responsabilidad de todos. Por su parte la Resolución 631 de 2015, define las características de calidad que debe tener un agua tratada cuando se va a descargar a un

cuerpo de agua mientras que el Decreto 50 de 2018 detalla las características que debe tener el agua tratada cuando se va a descargar al suelo. Adicionalmente aquellos caficultores que soliciten un permiso de vertimiento a las autoridades ambientales, deben primero garantizar que dichas aguas residuales ya fueron tratadas y que durante este tratamiento se logró reducir en más de 80% su contaminación, en caso omiso los caficultores pueden ser sometidos a sanciones especificadas en la Ley 1333 de 2009 a través de los decretos y resoluciones que dictan las fórmulas para calcular las multas cuando no se cumple con la normativa. Otra alternativa está relacionada con el pago de la tasa retributiva que es un impuesto por el nivel contaminación residual en las aguas tratadas donde las tarifas fluctúan en función de lo dictaminado por el Decreto 2667 de 2012, el cual indica que las aguas más limpias después de tratamiento son aquellas que pagan una menor tasa retributiva. Es importante aclarar que si la finca tiene acceso al alcantarillado público no requiere solicitar un permiso de vertimiento a las autoridades ambientales y el valor del servicio de disposición se fijará en función de un volumen mínimo de 1.600 m<sup>3</sup> por mes con un costo aproximado de COL\$2.000 por m<sup>3</sup> de agua.

En lo referente al reúso se especifica que las descargas de aguas tratadas al suelo, a los cuerpos de agua superficial o reusadas para actividades como el riego de sementeras o almácigos, deben cumplir con estrictas características de calidad descritas en la Resolución 1207 de 2014. El 90% de las aguas contaminadas de Colombia se descargan en principal cuenca hidrográfica de Colombia (Cauca-Magdalena) y generalmente provienen de propiedades que no hacen un tratamiento adecuado de las aguas residuales, por esta razón es prioritaria seguir los lineamientos de la Política para la gestión integral del recurso hídrico, publicada en 2010 por el Ministerio de Medio Ambiente, cuyo objetivo ejecutar los planes de ordenamiento en el manejo cuencas hidrográficas mediante procesos de verificación realizados por las Corporaciones Autónomas Regionales (CARS) las cuales deben garantizar el cumplimiento de la normativa vigente por parte de los usuarios.

Un uso alternativo o aprovechamiento potencial de las aguas residuales del café y del mucílago del café consiste en utilizarlos como un sustrato para la producción ácidos orgánicos reportados por su acción bioherbicida que pueden a su vez sustituir parcialmente los herbicidas de síntesis química frecuentemente usados en las fincas cafeteras dentro de los planes de manejo integrados de las arvenses.

### 2.3 Las arvenses y su manejo integrado en los sistemas de producción de café

Las arvenses llamadas vulgarmente malezas, son especies de la vegetación nativa o silvestre que conviven y compiten por recursos con los cultivos (Rivera, 2004). En el caso particular de la zona cafetera colombiana, Gómez y Rivera en 1995, describieron 170 especies de arvenses de ocurrencia frecuente en plantaciones de café localizadas en altitudes entre los 1.000 y 1.800 m, con temperaturas entre 17,5 y 23 °C. Encontraron que el 45% de estas arvenses interfieren en alto grado con las plantas de café, el 35% en grado medio, el 5% en grado bajo y el 15% interfieren en un grado muy bajo, a este último grado se le denomina “*arvenses nobles*” o “*coberturas nobles*”; las cuales protegen los suelos de la erosión ocasionada por la lluvia y juegan un papel muy importante en la conservación de la humedad del suelo en épocas secas. Dentro de las familias de arvenses con mayor número de especies reportadas en la zona cafetera se encuentran la familia Gramineae (17,65%), Compositae (16,47%), Euphorbiaceae (4,7%), Amaranthaceae (4,12%) y Rubiaceae (4,12%). En esta clasificación se destacan 25 especies de arvenses nobles que actúan como coberturas y protegen el suelo de los lotes cafeteros disminuyendo la erosión hídrica hasta en un 97%. Estos autores señalan que en ausencia de un correcto plan de manejo integrado, las arvenses pueden interferir durante las etapas de almácigo y en los primeros años del cultivo ya que compiten con las plantas de café por recursos como espacio, luz, agua y nutrientes. Desde el punto de vista económico, los costos de MIA son más significativos durante los dos primeros años del ciclo de vida del cultivo ya que representan entre el 20% y un 29% de los costos de instalación y levante; y por otro lado representan entre el 6% y el 8% de los costos en la etapa productiva del café (Duque et al., 2021).

El Manejo Integrado de Arvenses (MIA) en fincas cafeteras es una práctica que fomenta la combinación de métodos culturales, mecánicos y químicos para disminuir los procesos de interferencia y competencia de las arvenses más agresivas con el cultivo del café, que pueden afectar negativamente los rendimientos y aumentar los costos de producción (Gómez & Rivera, 1994; Rivera, 1994; Rivera, 1997a; Rivera, 1997b; Rivera, 2000; Hincapié & Salazar, 2007; Salazar & Hincapié, 2009). En comparación con los planes de manejo convencional en donde prima el control químico, la adopción por parte de los caficultores del MIA representa beneficios como la reducción de los costos de mano de obra, la disminución del uso indiscriminado de herbicidas químicos, menores consumos de agua y una reducción del riesgo de contaminación

ambiental. Es importante subrayar que al no implementar un manejo integrado de arvenses en fincas cafeteras se pueden tener disminuciones del rendimiento hasta del 66,5% y aumentos entre el 17 al 22% de los costos de producción.

Salazar e Hincapié (2007), también analizaron los procesos de competencia e interferencia de las arvenses con el cultivo del café, categorizando las arvenses predominantes según su grado de interferencia y resaltando que la correcta identificación de las arvenses de baja interferencia (arvenses nobles) son el punto de partida para iniciar un manejo selectivo en donde se controlen principalmente las arvenses de interferencia alta y media con el objetivo de establecer especies de coberturas nobles como una alternativa para aumentar la sostenibilidad de los sistemas de producción de café. Esta metodología a su vez estuvo soportada por el estudio de Rivera (1997), en el que se orientan las prácticas de manejo integrado de arvenses del cultivo del café en relación con los niveles de interferencia de las distintas especies predominantes y su cobertura. Este trabajo parte de una descripción taxonómica y fotográfica de las especies de arvenses por su grado de interferencia (alta, media y baja), que sirve como una herramienta para su identificación y categorización en las fincas cafeteras colombianas. Los resultados indican la importancia del reconocimiento visual de las arvenses en el cafetal y la estimación de su prevalencia en los lotes como el primer paso para definir las mejores prácticas de manejo de las arvenses de mayor interferencia y así lograr un establecimiento de las arvenses nobles que disminuya el uso de herbicidas de síntesis química y por ende los costos de producción. Rivera (2004), reporta los avances obtenidos en la producción cafetera al utilizar un manejo integrado de arvenses en combinación con la siembra de cultivos semestrales intercalados en cafetales renovados por zoca y mediante la integración del uso del “*selector de arvenses*” como un equipo para establecer coberturas. Los resultados de este estudio resaltan la importancia del manejo selectivo de las arvenses para no afectar la producción de café y destaca el establecimiento de coberturas de arvenses nobles y el maní forrajero (*Arachis pintoi*) como una alternativa sostenible que reduce la erosión y aumenta la eficacia de las practicas integradas de manejo de arvenses en el cultivo.

Salazar & Hincapié (2009), analizaron el grado de interferencia de cuatro arvenses *Paspalum paniculatum*, *Commelina* sp., *Bidens pilosa* y *Emilia sonchifolia* con el cultivo del café en condiciones de la zona cafetera central colombiana. En este estudio se evaluaron cuatro niveles de cobertura de cada una de estas especies y dos épocas de interferencia. Encontrando que estas arvenses interfirieron de manera permanente entre los 0 a 48 meses de edad del café y ocasionaron

---

reducciones del rendimiento del café hasta del 60% durante los cinco años del ciclo productivo. A su vez, López, Villalba, Salazar y Cárdenas (2012), estandarizaron una metodología para implementar estrategias de manejo integrado de arvenses en fincas cafeteras a partir de un plan de buenas prácticas agrícolas que recomienda la ejecución de una secuencia lógica de las listas de chequeo que deben realizar los caficultores al controlar las arvenses en sus fincas.

Salazar, Hincapié, Menza y Torres (2020), realizaron una descripción detallada de los métodos de manejo químico de arvenses más utilizados en fincas cafeteras y sus efectos sobre la erosión, la calidad de suelos y las aguas, su efecto en la diversidad, la acumulación de sustancia tóxicas en los productos cosechados, los daños ocasionados a los cultivos y el desarrollo de la resistencia de las arvenses a herbicidas. Este trabajo presenta una clasificación de los diferentes herbicidas químicos usados en el cultivo del café, por su modo y mecanismo de acción, los factores que afectan su aplicación y la respuesta diferencial de las arvenses a los diferentes ingredientes activos. Adicionalmente analizaron los efectos de varios herbicidas químicos como glifosato, glufosinato de amonio y paraquat sobre el crecimiento y desarrollo del café, así como la importancia del uso del selector de arvenses como una herramienta que acelera el establecimiento de coberturas nobles en los cafetales y que puede reducir los costos de desyerbas hasta en 20% durante el primer año y hasta 45% para el segundo año de edad de la plantación. Adicionalmente, señalan que gran parte de la eficacia y persistencia de los controles químicos utilizados en fincas cafeteras dependen de factores como la formulación, el tipo de aplicación y la época en que se aplican.

A pesar de su efectividad, el uso de herbicidas de síntesis química en los sistemas de producción cafetera es cada vez más restringido debido a una creciente demanda de los consumidores por un producto con menores trazas de pesticidas y por las repercusiones que estos productos ocasionan sobre el medio ambiente y sobre la salud de las personas que los aplican. Una de las alternativas para sustituir estos herbicidas químicos son los llamados “*Bioherbicidas*” que son productos aprobados por los programas de certificación de agricultura orgánica ya que son obtenidos a partir de extractos de plantas alelopáticas, aceites vegetales o ácidos orgánicos que además de controlar las arvenses, no representan un riesgo para los ecosistemas ni para quienes los utilizan.

## **2.4 Uso potencial de los ácidos orgánicos de la fermentación de las aguas residuales del café como sustancias bioherbicidas**

La fermentación aeróbica del café recién despulpado es un proceso de la etapa de beneficio que facilita el lavado del pergamino gracias a la descomposición del mucílago mediada por diferentes microorganismos. Este proceso que en general tarda entre 15 y 18 horas en dependencia de condiciones ambientales como la temperatura y la humedad relativa, transcurre desde que el café recién despulpado es depositado en tanques de fermentación hasta que más del 80% del mucílago se ha degradado y permite ser removido mediante el lavado con agua limpia. La fermentación aeróbica es un proceso que le confiere características organolépticas particulares a los granos de café tales como la fragancia y la acidez, esta última determinada en gran medida por los ácidos orgánicos que se generan durante el proceso fermentativo y dentro de los cuales sobresalen el ácido acético, ácido láctico y ácido cítrico; ácidos que a su vez han sido reportados por la literatura por su efecto bioherbicida.

Puerta & Ríos (2011), cuantificaron los contenidos de diferentes sustancias que influyen sobre los procesos de fermentación del mucílago del café y los cambios químicos que se presentan en función del tiempo y la temperatura. El estudio se enfocó en caracterizar químicamente la fermentación natural del mucílago del café definida como un proceso perezoso mediado por bacterias y levaduras cuya actividad metabólica está directamente relacionada con los contenidos de azúcares y sustancia pécticas, así como por la temperatura; encontrando que la concentración del ácido acético producido durante la fermentación puede ser altamente variable en función del contenido de las sustancias ácidas presentes en el mucílago del café recién despulpado y de los tiempos de fermentación. Estos autores describieron además que a medida que aumentaba el tiempo de fermentación, también aumentaba la acidez total entendida como la medida del contenido de sustancias ácidas presentes en el mucílago del café, reportando que la acidez titulable total de un litro de mucílago de café fresco que presentó un valor promedio de 969 mg de  $\text{CaCO}_3$ , aumentó con el tiempo de fermentación, triplicando su valor a las 20 horas y alcanzando un valor promedio 7.156 mg de  $\text{CaCO}_3$  a las 74 horas y a temperatura ambiente.

Puerta, Marín y Osorio (2012), evaluaron el potencial del mucílago del café en fermentaciones industriales mediante el conocimiento detallados de los microorganismos involucrados en dicho proceso. En el estudio de identificaron y cuantificaron las bacterias y

levaduras del mucílago de café fresco y fermentado hasta por 74 horas a temperatura ambiente y en sistemas abiertos, en donde se encontraron principalmente microorganismos de los géneros *Lactobacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Flavobacterium* spp., *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Torulopsis* spp., *Rhodotorula* spp. y *Cryptococcus* spp. En el mucílago de café sin fermentar se cuantificaron entre  $69 \times 10^5$  a  $357 \times 10^5$  colonias mesófilas por gramo de mucílago y de  $14 \times 10^5$  a  $38 \times 10^5$  levaduras por gramo de mucílago. Los mayores recuentos se encontraron en el mucílago de café obtenido de frutos maduros y granos seleccionados. Las bacterias *Lactobacillus* spp., predominaron en el mucílago fresco y fermentado de los tres niveles de madurez de grano, encontrando el mayor crecimiento en el café maduro reportando un recuento máximo a las 44 horas. A medida que aumentaba el tiempo de fermentación del mucílago de café, la concentración de microorganismos aerobios alcanzó valores entre  $74 \times 10^5$  a  $96 \times 10^5$ , a las 74 horas. Los coliformes se redujeron debido a la acidificación del medio y a las 20 horas se encontró una concentración de  $34 \times 10^5$  levaduras, recuentos que aumentaron significativamente hasta  $150 \times 10^5$ , después de las 68 horas, con respecto a los tiempos previos.

Bressani, Martinez, Inácio, Borem, y Freitas (2020), demostraron cómo los ácidos orgánicos y los perfiles volátiles impactaban el proceso fermentación del café al usar cuatro microorganismos precursores *Meyerozyma caribbica* (CCMA 0198), *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0543), *Candida parapsilosis* (CCMA0544) y *Torulasporea delbrueckii* (CCMA 0684) inoculados en dos variedades de café Bourbon Amarelo y Canário Amarelo. El estudio empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la caracterización y cuantificación de los ácidos orgánicos producidos durante el proceso fermentativo del mucílago del café, así como el análisis de otros compuestos volátiles que inciden directamente sobre el sabor de la bebida. Los resultados indicaron que al inicio del proceso fermentativo se presentaron altos contenidos de ácidos cítrico, málico, succínico, láctico, oxálico, isobutírico y propiónico, además de 105 compuestos volátiles, además observaron que una vez transcurría un mayor tiempo de fermentación, los principales compuestos encontrados fueron alcoholes y aldehídos. Palma & González (1989), analizaron las aguas de despulpado de café utilizando un volumen de 4,5 Litros de agua por kilogramo de café pergamino seco, encontrando un aumento de la concentración inicial de ácido cítrico de 2.511 ppm a una concentración final de 7.440 ppm a las 60 horas de fermentación; en donde el ácido acético aumentó su concentración de 212 ppm a 708 ppm en 60 horas de fermentación.

Rodríguez & Zambrano (2011), estudiaron los rendimientos de obtención de alcohol a partir del mucílago del café y determinaron la factibilidad técnica y económica del proceso productivo. En este estudio se caracterizó el mucílago proveniente de desmucilagador mecánico del sistema Becolsub evaluando 16 tratamientos con cuatro tipos de hidrólisis y cuatro inóculos de levadura para favorecer la fermentación. Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas entre los rendimientos de alcohol al utilizar levaduras comerciales; adicionalmente se determinó que la solución mucílago-agua representó el 25,24% del peso del fruto fresco, mientras que los residuos de la destilación representaron el 44,42% del volumen inicial puesto a destilar, generando 11 litros de vinazas por cada litro de etanol obtenido. Estos hallazgos son de gran importancia ya que el ácido acético puede ser producido a escala industrial mediante procesos de oxidación del etanol (Guillamón y Mas, 2011).

Dentro de los ácidos orgánicos que se producen durante los procesos fermentativos del café, el ácido acético, el ácido cítrico y el ácido láctico han sido reportados como agentes bioherbicidas de contacto avalados por la agricultura orgánica dada su alta eficacia, bajos riesgos para la salud humana y su alta biodegradabilidad por parte de los microorganismos del suelo (Chinery, 2001; Owen, 2002; Montero et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2018; Mahachai & Subsoontorn, 2021). El mecanismo de acción de estos tres ácidos orgánicos es similar al de algunos herbicidas post-emergentes de contacto de síntesis química como el paraquat y el glufosinato de amonio los cuales actúan directamente en la pared celular de las arvenses induciendo procesos oxidativos de ácido grasos que conducen a la desecación rápida de los tejidos foliares afectando la fotosíntesis y causando la muerte de las arvenses (Montero et al., 2016; Webber et al., 2018).

Si bien los estudios previos de caracterización de los ácidos orgánicos reportados por su acción bioherbicida presentes en aguas residuales del café, solo se han realizado en procesos fermentativos de máximo 72 horas, se ha confirmado el aumento progresivo de la acidez titulable y de la acidez volátil durante estos tiempos de fermentación de las aguas del lavado alcanzando valores de 0,67 meq/100g a las 24 horas después de haber sido generadas, en donde el 76% correspondía a la acidez fija y el 24% a la acidez volátil, cuya composición correspondía a ácidos orgánicos como el acético, cítrico, láctico, oxálico, malónico y galacturónico (Centanaro y Gutiérrez, 1991; Zuluaga et al., 1991). Cabe subrayar que la naturaleza innovadora del presente estudio está sustentada en evaluar la dinámica de producción de ácidos orgánicos en tiempos de fermentación aeróbica hasta de 16 días utilizando dos sustratos de aguas residuales provenientes

de dos sistemas de lavado del café como los son el Tanque Tina® y el Ecomill® utilizados frecuentemente por los caficultores colombianos.

## **2.5 Determinación del porcentaje de control de arvenses mediante el análisis comparativo de la Cobertura Verde Fraccional del Dosel (CVF) estimada con la aplicación digital Canopeo®**

Posteriormente a la caracterización de la dinámica de producción de ácidos orgánicos en aguas residuales provenientes de los dos sistemas de lavado del café evaluados, inició la estimación del potencial bioherbicida de los filtrados fermentados de ambos sustratos al ser aplicados sobre diferentes grupos de arvenses predominantes en la zona cafetera colombiana. Esta estimación del efecto bioherbicida se realizó mediante la app Canopeo®, la cual es una aplicación digital para móviles iOS y Android y que fue desarrollada en 2015 por un equipo de investigadores de la Universidad de Oklahoma para medir la cobertura verde fraccional del dosel de especies vegetales. La cobertura verde fraccional (FGCC, por su sigla en inglés, *Fractional Green Canopy Cover*) es una unidad de diagnóstico para estimar de manera fácil y no destructiva algunas variables como el desarrollo del dosel de las plantas, la intercepción de la luz y la distribución de la evapotranspiración (Patrignani & Ochsner, 2015). Esta herramienta de análisis de imágenes, capturas de celular y videos está siendo ampliamente usada para la investigación en ciencias ecológicas, ambientales y agronómicas debido a su alta precisión, alta eficiencia y bajo costo, ya que la aplicación Canopeo® es de descarga gratuita para dispositivos móviles. La aplicación fue desarrollada en la plataforma de programación Matlab (Mathworks, Inc., Natick, MA), la cual se basa en las proporciones de color entre el rojo y el verde (R/G), el azul al verde (B/G) y un índice de exceso de verde ( $2G - R - B$ ).

Rasmussen et al., (2010), validaron el uso de la aplicación Canopeo® para realizar mediciones sobre la tasa de crecimiento de las arvenses después de procesos de labranza. De igual manera en estudios realizados por Salazar en 2024, se evidenció la utilidad de esta aplicación para evaluar como variable de respuesta el porcentaje de cobertura de arvenses de la zona cafetera colombiana sobre el suelo a los 21, 35 y 60 días después de la aplicación de herbicidas en dos estaciones experimentales de Cenicafé realizando en cada unidad experimental se realizaron seis muestreos, los cuales se promediaron para obtener un solo valor por unidad experimental por cada

---

época de evaluación. Posteriormente, utilizando un análisis de regresión lineal simple, verificó que los resultados de la medición de cobertura de arvenses con la aplicación Canopeo® fuera semejante a la medición visual realizada con el cuadrado de 0,25 m<sup>2</sup>.

Los resultados de los análisis del porcentaje de cobertura verde fraccional de las imágenes de Canopeo® se observan en una imagen binaria donde los píxeles blancos corresponden a los píxeles de dosel verde y los píxeles negros que corresponden a los píxeles de dosel no verde. La cobertura verde fraccional del dosel de las arvenses puede variar de 0% (sin cobertura verde de dosel) a 100% (cobertura absoluta del dosel verde). La app Canopeo® tiene la capacidad de reducir el ruido eliminando píxeles verdes aislados que no cumplen con las especificaciones de relación de color y que a veces pueden aparecer en otros objetos o que no son parte exclusiva del dosel verde (Lati et al., 2011). En Canopeo®, se puede extraer un subconjunto de fotogramas determinados según especificaciones del estudio en donde luego se analiza cada imagen de forma separada, los datos porcentuales son almacenados posteriormente un archivo de hoja de cálculo de Microsoft Excel con el nombre de archivo de imagen y el valor de FGCC para cada imagen (Patrignani & Ochsner, 2015).

Posteriormente a través de medidas comparativas entre el porcentaje de cobertura de las arvenses registrados con Canopeo® antes y después de la aplicación foliar de las sustancias herbicidas que se están evaluando frente a un tratamiento testigo (sin herbicida), se puede determinar tanto el porcentaje de control de arvenses obtenido con cada tratamiento como las variaciones porcentuales en los controles a medida que transcurre el tiempo de los muestreos.

### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1 Tipo de investigación

La investigación es de tipo descriptivo-explicativo ya que el alcance del estudio durante la primera etapa correspondiente a la caracterización en condiciones de laboratorio de las aguas residuales del lavado del café, busca entender descriptivamente aquellos cambios químicos, físicos y microbiológicos que se presentan durante procesos prolongados de fermentación aeróbica de dos sustratos correspondientes a las mieles del Ecomill® y a las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®. Mientras que durante la segunda etapa, el alcance de la investigación gira hacia el enfoque explicativo determinado principalmente por el carácter experimental de la evaluación en condiciones controladas del efecto bioherbicida de los ácidos orgánicos que se generan durante procesos prolongados de fermentación aeróbica de los dos sustratos de las aguas residuales del lavado previamente caracterizados, en la primera etapa.

#### 3.2 Población y muestreo

Debido al enfoque cuantitativo de las dos etapas en que fue realizada la investigación, tanto la población como la muestra de cada etapa son diferentes. Para la primera etapa desarrollada en el laboratorio de aguas de Cenicafé, la población correspondió a los dos sustratos provenientes de dos fuentes aguas residuales del lavado del café representados por (i) las mieles del Ecomill® y (ii) las aguas de la primera cabeza de lavado del Tanque Tina®. Por su parte las muestras de esta etapa correspondieron a las colectas que se realizaron durante cinco semanas de las aguas residuales del lavado provenientes de los dos sistemas evaluados. Las muestras de esta etapa comprendieron volúmenes de siete litros de aguas residuales provenientes de los dos sistemas que fueron colectados posterior al lavado del café pergamino húmedo de la variedad Cenicafé 1, el cual previamente había estado sometido a tiempos de fermentación aeróbica que variaron entre las 16 y las 18 horas hasta llegar al punto ideal de lavado determinado mediante el método Fermaestro®.

Para la segunda etapa que se llevó a cabo en condiciones de casa de malla, la población correspondió al lote de producción de semilla de café ubicado en la Estación Experimental La

Catalina en Pereira (Risaralda) en donde se colectaron de manera aleatoria cespedones o tepes que presentaban una alta diversidad de especies de arvenses predominantes de la zona cafetera colombiana. Las muestras en esta etapa correspondieron a 35 cespedones colectados aleatoriamente en el lote de café y que fueron depositados en bandejas plásticas de 1400 cm<sup>3</sup> de capacidad (unidad experimental) que fueron posteriormente trasladados a la casa de malla ubicada en la sede Planalto de Cenicafé.

### **3.3 Procedimiento de investigación**

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo metodológico de esta investigación se realizó en dos etapas; en donde la primera etapa de laboratorio correspondió a la caracterización química, física y microbiológica de dos sustratos fermentados de aguas residuales del café provenientes de dos sistemas de lavado de café (Ecomill® y Tanque Tina®) los cuales son utilizados comercialmente por los caficultores durante la poscosecha o beneficio del café. Mientras que la segunda etapa correspondió a la evaluación en condiciones de casa de malla del efecto bioherbicida de los filtrados fermentados de los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café en comparación con tratamientos compuestos por ácidos orgánicos en disolución y con herbicidas de síntesis química utilizados tradicionalmente en fincas cafeteras.

#### **3.3.1 Etapa 1. Caracterización química, física y microbiológica de aguas residuales del lavado del café sometidas a procesos prolongados de fermentación aeróbica**

Esta etapa de la investigación inició con la selección visual en campo y recolección manual durante cinco semanas de cerezas de café maduro de la variedad Cenicafé 1, en lotes de producción de semilla certificada en la estación experimental Naranjal ubicada en el municipio de Chinchiná (Caldas, Colombia). Posteriormente se determinó el estado de madurez de la masa cosechada de las cerezas mediante la herramienta Cromacafé®, la cual consiste en una escala de ocho colores que representan los ocho estados de madurez de los frutos de café: Verde (1), Verde pintón (2), Pintón (3), Maduro I (4), Maduro II (5), Sobre-maduro I (6), Sobre-maduro II (7) y Seco (8). Idealmente una buena calidad de recolección de café debe tener más del 80% de frutos maduros (4 y 5) y sobre-maduros (6 y 7) así como menos del 2,5% de frutos verdes (1); en donde debe

evitarse al máximo la recolección de frutos verde pintones y pintones (2 y 3) ya que estos deterioran la calidad en tasa del café y son responsables de sabores amargos o astringentes en la bebida (Peñuela et al., 2022). Al garantizar una buena calidad de recolección en donde más del 80% de los frutos presentaban un grado de madurez adecuado (maduros y sobre-maduros), se garantizó una alta concentración de azúcares solubles y pectinas en el mucílago, sustancias que a su vez son precursoras de las síntesis de ácidos orgánicos durante los procesos fermentativos tanto del café como de las aguas residuales del lavado.

Posteriormente, los granos cosechados fueron transportados hasta la unidad de beneficio de Cenicafé en donde se clasificaron mecánicamente por medio de un separador hidráulico de tolva y tornillo sinfín (SHTS) con capacidad para seleccionar 2500 kilogramos de cereza por hora, este equipo separa por densidad los frutos vanos, brocados y secos denominados flotes. Después de esta clasificación hidráulica, los frutos fueron despulpados mecánicamente en una máquina despulpadora de cilindro horizontal marca Estrella Plus N°6 ®, la cual separa por compresión la pulpa del pergamino en baba, es decir aquel pergamino que aún presenta el mucílago fresco adherido en su superficie. Posteriormente, el café recién despulpado fue transportado mediante un tornillo sinfín hacia una zaranda de acero con perforaciones de 8,4 mm en donde se realizó una segunda clasificación esta vez por tamaño de grano. Finalmente, el café pergamino en baba fue transportado por gravedad a tanques de fermentación aeróbica con capacidad de 3.500 kg en donde permaneció temporalmente hasta que el mucílago había sido degradado por los microorganismos, presentando una tasa de remoción de más del 95% la cual fue determinada a través de la herramienta Fermaestro® la cual había sido sumergida previamente dentro del tanque de fermentación, con el propósito de indicar el momento preciso en el que café se encontraba en el punto ideal para ser lavado con agua limpia. La duración entre el inicio del proceso fermentativo y el punto ideal de lavado fluctuó entre las 16 y las 18 horas en función de las condiciones promedio de temperatura y humedad relativa reportadas por la estación climática cercana a la unidad de beneficio de Cenicafé ubicada en Chinchiná (Caldas).

Una vez la masa de café alcanzó el tiempo de fermentación necesario para remover la mayor parte del mucílago mediante el lavado con agua limpia, se dispusieron 150 kilogramos de café pergamino para ser lavados en el equipo Ecomill® LH300 y 150 kilogramos de café pergamino para ser lavados por agitación manual en el Tanque Tina®. Después del proceso de lavado del café en cada uno de los dos sistemas, se colectaron en baldes plásticos abiertos de 12

litros de capacidad, muestras independientes de siete litros de cada sustrato de aguas residuales correspondientes a (i) las mieles del Ecomill® y a (ii) las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®, las cuales fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio de aguas de Cenicafé en donde se adaptó una malla plástica de 7 × 7 mm en la boca de los baldes abiertos para evitar el ingreso de insectos o material vegetal que pudiesen alterar la composición orgánica o microbiológica de los sustratos durante el transcurso de la fermentación aeróbica.

La caracterización química de los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café consistió en evaluar las variaciones en el pH, la acidez titulable (AT) y la dinámica de producción de ácidos orgánicos que se presentó a lo largo de 16 días de fermentación aeróbica, con el objetivo de definir los tiempos mínimos de fermentación en donde se presentaban los máximos picos de acidez en ambos sustratos, momento en que se detenía el proceso fermentativo mediante refrigeración a -20°C para suspender la actividad de los microorganismos precursores de la síntesis de los ácidos orgánicos. Luego durante los 16 días de fermentación se homogenizaron por agitación mecánica ambos sustratos en baldes y se tomaron submuestras de 100 mL para realizarles las determinaciones de pH y Acidez Titulable. Adicionalmente a medida que transcurrió el proceso de fermentación de cada una de las muestras de los dos sustratos, se cuantificaron mediante la técnica de cromatografía líquida (HPLC), las concentraciones de los ácidos orgánicos reportados por su acción bioherbicida que corresponden al ácido acético, cítrico y láctico a los 0, 4, 8, 12 y 16 días de fermentación, con el objetivo de conocer las variaciones tanto en la composición como en la concentración de estos ácidos orgánicos en cada uno de los sustratos de aguas residuales a través del tiempo. Por su parte la caracterización física de las aguas residuales consistió en la determinación de los sólidos totales de las muestras de los dos sustratos a los 0, 2, 4, 8, 12 y 16 días de fermentación.

La caracterización microbiológica consistió en el análisis del comportamiento poblacional de los microorganismos nativos presentes en ambos sustratos de aguas residuales del café, para lo cual se cuantificaron tanto la riqueza como la abundancia de los principales grupos funcionales que participaban durante el proceso de fermentación aeróbica, adicionalmente se determinaron las fluctuaciones en la diversidad de los microorganismos que se presentaban en las poblaciones analizadas a medida que transcurrió el tiempo de fermentación.

### **3.3.2 Etapa 2. Evaluación en casa de malla del efecto bioherbicida de los filtrados fermentados de los dos sustratos de las aguas residuales del lavado del café**

Esta etapa comenzó con la definición de los siete tratamientos que fueron sometidos a evaluación en condiciones controladas de casa de malla, los cuales correspondieron a: (i) filtrados fermentados de las mieles del Ecomill®, (ii) filtrados fermentados de las aguas de la primera cabeza de lavado del tanque-tina®, (iii) ácido acético al 20%, (iv) ácido cítrico al 10%, (v) mezcla de ácido acético al 20% + ácido cítrico al 10%, (vi) herbicida glufosinato de amonio en dosis de 10 mL/Litro y (vii) testigo absoluto sin aplicación. Adicionalmente se definió un diseño experimental de bloques completos al azar (5 bloques × 7 tratamientos; n=35) el cual se aplicó para la colecta de las muestras de las arvenses en campo, para la distribución de las unidades experimentales al interior de la casa de malla y para el análisis estadístico de los datos.

Dentro de los factores condicionales que se tuvieron en cuenta para realizar la colecta de las muestras de arvenses en campo se definió previamente que estas debían provenir de un lote de producción de café en descanso que presentara una alta diversidad de especies de arvenses características de la zona cafetera colombiana, en donde no se hubiesen realizado aplicaciones de herbicidas de síntesis química durante el último año. Una semana antes de la colecta de los cespedones en un campo experimental de café ubicado en la Estación Experimental La Catalina en Pereira (Risaralda), se realizó un control mecánico de las arvenses con guadaña seguido por la marcación con cuerdas de fibra y estacas de cinco bloques de 30 metros de longitud y 4 metros de ancho, los cuales definían el transecto sobre el cual se colectaron aleatoriamente los 35 cespedones que fueron depositados en bandejas plásticas de 1400 cm<sup>3</sup> de capacidad y trasladados a casa de malla en la sede Planalto de Cenicafé en donde fueron distribuidas consistentemente con la condición de bloqueo utilizada durante la toma de muestras en campo.

Para el monitoreo de las condiciones ambientales dentro de la casa de malla se instaló una estación meteorológica portátil para el registro a escala cincominutal de variables como temperatura (mínima, media y máxima), humedad relativa y radiación solar. Una vez las bandejas fueron distribuidas dentro de la casa de malla, se hicieron riegos cada dos días para estimular la germinación de las semillas y para promover un crecimiento foliar de las arvenses que permitiera realizar visualmente la caracterización botánica de las especies presentes en cada bandeja. Posteriormente cuando las arvenses presentaron una altura mínima de 10 cm con respecto a la

superficie del suelo de las bandejas, se realizaron las aplicaciones foliares correspondientes a los siete tratamientos y se realizaron las mediciones con la app Canopeo® de los porcentajes de cobertura de las arvenses de cada bandeja a los 0, 3, 7, 14 y 21 días después de la aplicación, mediciones que posteriormente fueron asociadas al porcentaje de control y a la persistencia obtenida con cada tratamiento.

### **3.4 Técnicas e instrumentos**

Durante el desarrollo metodológico de la investigación se utilizaron diferentes técnicas e instrumentos de recolección de la información en cada una de las dos etapas referenciadas anteriormente. Las técnicas corresponden a los procedimientos sistemáticos llevados a cabo para realizar las mediciones y observaciones del comportamiento de las variables de respuesta evaluadas, mientras que los instrumentos son aquellas herramientas o equipos que fueron utilizados para coleccionar y recopilar la información con suficiente validez y confiabilidad durante las diferentes etapas de la investigación. Dentro de los instrumentos también se incluyeron las herramientas tecnológicas como aplicaciones móviles y software para análisis estadístico. El proceso de beneficio de los granos inició con el depósito de las cerezas en una tolva de recibo recubierta con baldosas de cerámica, posteriormente por gravedad los granos fueron sometidos a una separación por densidad en un separador hidráulico de tolva y tornillo sinfín (SHTS) con capacidad para seleccionar 2500 kilogramos de cereza por hora, posteriormente las cerezas clasificadas transportadas por un sinfín y despulpadas en una despulpadora de cilindro horizontal marca Estrella Plus N°6 ® y luego el pergamino en baba fue transportado por sinfín hasta una zaranda metálica de clasificación de acero con aberturas de 8,4 mm para ser clasificado por tamaño. Finalmente, el pergamino en baba pasó a tanques de fermentación aeróbica con capacidad de 3500 kg en donde permaneció durante 16 horas antes de ser lavado en el punto ideal de lavado determinado mediante Fermaestro® en los dos sistemas correspondientes al equipo Ecomill® LH300 y el Tanque Tina® operados bajo las condiciones actuales de la unidad de beneficio de Cenicafé. Después del proceso de lavado del café en cada uno de los dos sistemas, se coleccionaron en baldes plásticos abiertos de 12 litros de capacidad, muestras independientes de siete litros de cada sustrato de aguas residuales correspondientes a (i) las mieles del Ecomill® y a (ii) las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®; las cuales fueron trasladadas inmediatamente al

laboratorio de aguas de Cenicafé en donde se adaptó una malla plástica de  $7 \times 7$  mm en la boca de los baldes abiertos para evitar el ingreso de insectos o material vegetal que pudiesen alterar la composición orgánica o microbiológica de los sustratos durante el transcurso de la fermentación aeróbica (Figura 1).



*Figura 1. Prácticas del beneficio del café y toma de muestras de aguas residuales del lavado (Foto 1. Recibo del café cereza en tolva; Foto 2. Clasificación de cerezas por densidad en separador hidráulico; Foto 3. Despulpado; Foto 4. Clasificación por tamaño del pergamino en baba en zaranda perforada; Foto 5. Fermentación del pergamino en baba en tanque; Foto 6. Determinación de punto de lavado con Fermaestro®; Foto 7. Lavado y colecta de mieles del Ecomill® LH 300; Foto 8. Lavado por agitación en Tanque tina®; Foto 9. Colecta de aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®. Determinación de pH; Foto 10. Inicio de fermentación aeróbica de las aguas residuales del lavado del café).*

### ***Determinación de sólidos totales***

La caracterización física de los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café se realizó mediante la determinación en laboratorio de los sólidos totales, con el objetivo de conocer las diferencias en la carga orgánica asociadas a la madurez de la masa café que daba origen a dichos sustratos, al volumen de agua utilizado para lavar cada kilogramo de café pergamino en

baba y a las fluctuaciones que se presentaban en esta variable a través del tiempo de fermentación. Los sólidos totales de las mieles del Ecomill® y de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® de cuatro semanas de muestreo, fueron determinados mediante el método termogravimétrico, para lo cual se colectaron en cápsulas de porcelana muestras de 100 mL de cada sustrato al día 0 y al día 16 de fermentación, que luego eran sometidas a evaporación en una estufa de convección forzada marca Memmert Universal UF110 a 105°C hasta peso constante determinado en una balanza analítica marca Mettler Toledo AG204 (Figura 2).



*Figura 2. Muestreo, pesaje inicial, secado mecánico y pesaje final de sólidos totales de los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café (Foto 1. Montaje de muestras en cápsulas de porcelana de 100 mL; Foto 2. Secado de muestras; Foto 3. Pesaje en balanza electrónica).*

El procedimiento comenzó con lavado, secado, pesaje y registro del peso de la cápsula de porcelana vacía, seguido por el llenado de dichas cápsulas con el volumen de 100 mL de cada sustrato de aguas residuales del lavado antes de ser llevadas a la estufa de secado. Finalmente, los contenidos de sólidos totales se cuantificaron mediante el análisis de las diferencias entre los valores registrados para el peso de la cápsula vacía (peso inicial) versus la cápsula con el sustrato seco (peso final) de cada uno de las aguas residuales, valores que corresponden a los pesos de los sólidos totales (ST) obtenidos después del secado, expresados en la unidad mg/L y determinados mediante la siguiente ecuación:

Donde:

$$ST = \frac{(A - B) * 1000000}{M} \triangleright$$

ST = Sólidos Totales (mg/L)

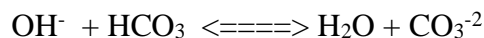
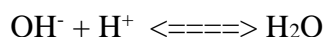
A = Peso de la cápsula + residuo seco (g)

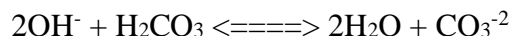
B = Peso de la cápsula vacía (g)

M = Volumen de la muestra (mL)

Posteriormente los resultados obtenidos de ST de los dos sustratos de aguas residuales se transformaron a unidades de Demanda Química de Oxígeno (DQO), la cual es una medida del equivalente del oxígeno necesario para oxidar químicamente la materia orgánica presente en las aguas residuales y que equivale a la cantidad de oxígeno que las sustancias reductoras, como la materia orgánica, presentes en un agua residual, necesitan para descomponerse sin la intervención de microorganismos; en donde a mayor contenido de DQO mayor será la contaminación de la muestra de agua (Rodríguez et al., 2022). Para el caso de las aguas residuales del café, la relación DQO/ST es de 1,2 (Zambrano & Isaza, 1998),

La caracterización química se realizó mediante la determinación del pH y la Acidez Titulable (AT) de los dos sustratos durante los 16 días de fermentación aeróbica, tomando muestras diarias de 100 mL de cada sustrato, a las cuales se les midió el pH utilizando un pH-metro marca HACH HQ-40D. La Acidez Titulable (AT) se determinó mediante titulación con hidróxido de sodio (NaOH) al 16% de concentración p/v, utilizando el pH de referencia 7,5; en donde los valores se representan volumétricamente en mL de NaOH gastados para alcanzar este nivel de pH y se expresan en la unidad internacional de AT en mg de CaCO<sub>3</sub>/L (Mettler & Weibel, 2018). La acidez es un indicador del poder corrosivo del agua residual y es causado por ácidos orgánicos débiles tales como, acético, tánico, fórmico y ácidos minerales fuertes tales como sulfúrico y clorhídrico. En aguas naturales no contaminadas la forma más común de ácidos es el CO<sub>2</sub> presente como ácido carbónico cuyas principales fuentes son la atmósfera. El punto final para la acidez total se obtiene a un pH en el cual se haya agregado la cantidad estequiométrica de OH<sup>-</sup> para completar las siguientes reacciones:

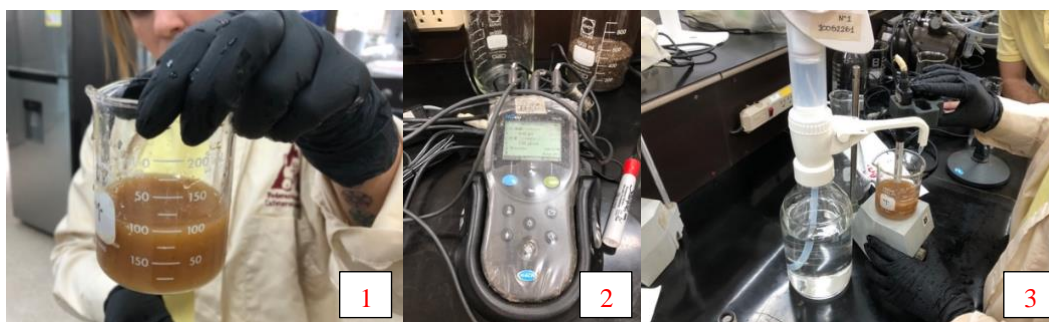




### ***Determinación de pH***

En la dinámica de formación de ácidos se determinó la evolución del valor de pH de las aguas residuales con el tiempo. Las muestras se recolectaron en recipientes de vidrio llenándolas completamente, evitando la agitación y la prolongada exposición al aire y se analizaron inmediatamente. Los materiales de laboratorio utilizados para la determinación de la acidez incluyeron una bureta digital de 50 mL, un beaker de 100 mL, una barra de agitación magnética y un pH metro con electrodo combinado.

El procedimiento inició con la toma de muestras de 100 mL de cada de sustrato en un beaker, al cual se adicionó un agitador magnético y se le introdujo el electrodo del pH metro. Cuando el pH de la muestra estaba por encima de 4,0 se adicionaron 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,02 N) hasta alcanzar un pH de 4 o menor. Se realizaron registros del volumen de ácido gastado y se adicionó lentamente el hidróxido de sodio (NaOH) a través de la bureta digital. Finalmente se tomó como punto final el valor de pH 7.5 y se registró el volumen de base consumido (Figura 3).



*Figura 3. Determinación de pH y Acidez Titulable de mieles del Ecomill® y aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® (Foto 1. Muestras de 100 mL de cada sustrato; Foto 2. Determinación de pH; Foto 3. Titulación de muestras con NaOH al 16%).*

### ***Determinación de acidez***

La acidez es una variable que fluctúa ampliamente en dependencia de las características de la muestra; por lo que un tamaño único de la muestra y de la concentración del hidróxido de sodio utilizado no está especificado. Por ejemplo, para la metodología del Standard Methods, en la que se utiliza NaOH (0,02 N), se recomienda seleccionar para muestras con acidez menor a 1.000 mg

como  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , un volumen de menos de 50 mg  $\text{CaCO}_3$ ; mientras que para muestras con acidez superior a 1.000 se recomienda tomar un volumen equivalente o menor a 250 mg de  $\text{CaCO}_3$  y utilizar NaOH (0,1 N) en la titulación. Para las aguas mieles de café se han obtenido buenos resultados tomando 100 mL y utilizando NaOH con concentraciones superiores al 15% según lo reportado por Izasa en 1996. Los resultados de la acidez se expresaron como mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ; y se obtuvieron mediante la siguiente ecuación:

$$\text{ACIDEZ (mg CaCO}_3/\text{L)} = [(A - B) * C] - [(D * E)] * 50.000/F$$

Donde:

A: Volumen de NaOH consumidos para la muestra (mL).

B: Volumen de NaOH consumidos para el blanco (mL).

C: Normalidad del NaOH.

D: Volumen de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  que es 0 si el pH de la muestra es menor o igual a 4,0 (mL).

E: Normalidad del  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

F: mL de muestra.

Para el análisis de los datos se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon con los datos de pH y AT, así como una prueba T-test para las muestras pareadas. Los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, para determinar si el método de lavado del café afectaba de manera significativa los valores de pH que se generan durante el proceso fermentativo.

Para la cuantificación de los ácidos orgánicos acético, cítrico y láctico mediante cromatografía líquida (HPLC) se tomaron muestras de ambos sustratos de 200 mL en tubos Falcon® a los 0, 4, 8, 12 y 16 días de fermentación aeróbica. Posteriormente se tomaron dos submuestras de 25 mL para cada momento que fueron depositadas en tubos Eppendorf® y centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman Coulter Allegra X-30R; se realizaron ciclos de centrifugación para lograr una correcta separación de los sedimentos y el sobrenadante. Luego se realizó la filtración de los sobrenadantes de todas las muestras utilizando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  que luego fueron envasados en viales Eppendorf® de 1mL y congelados a -80°C para su posterior análisis. Los tres ácidos orgánicos fueron determinados en

un equipo de cromatografía líquida HPLC Waters 600E el cual estaba acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD-996), con una columna Supelcogel C-610H (300 mm, 7.8 mm), Supleco a una temperatura de 35°C y un flujo de 0,5 mL/min con agua desionizada acidificada (0,1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y detección a 210 nm (Figura 4).



*Figura 4. Muestreo, procesamiento y cuantificación de ácidos orgánicos acético, cítrico y láctico de los dos sustratos de aguas residuales del café mediante cromatografía líquida HPLC (Foto 1. Submuestras de 25 mL de cada sustrato; Foto 2. Centrifugación; Foto 3. Separación de sobrenadantes; Foto 4. Filtrado; Foto 5. Deposición de muestras; Foto 6. Análisis de muestras en HPLC).*

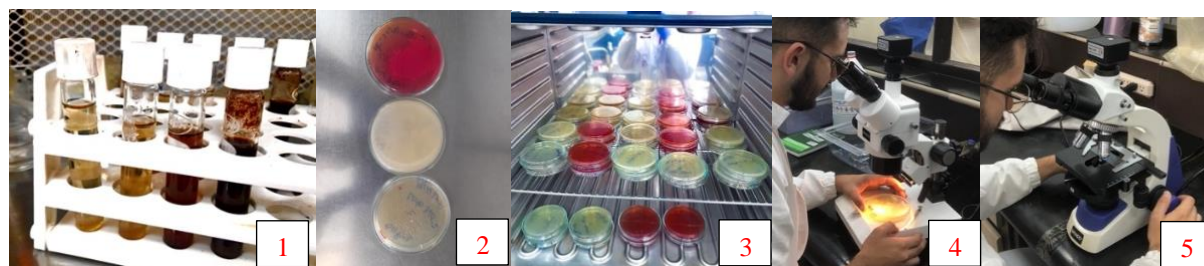
### ***Caracterización microbiológica***

La caracterización microbiológica de los dos sustratos de aguas residuales del café se realizó con el propósito de conocer las variaciones en la dinámica poblacional de los microorganismos involucrados en la síntesis de ácidos orgánicos durante procesos de fermentación prolongada de dichos sustratos. El proceso comenzó con la colecta en tubos Falcon estériles de 50 mL de cada sustrato a los 0, 4, 8, 12 y 16 días del proceso de fermentación aeróbica, con el objetivo de determinar la diversidad de microorganismos e identificar los géneros presentes en cada una de las aguas residuales, identificando seis diferentes grupos funcionales reportados por la literatura como actores principales de los procesos fermentativos de la materia orgánica (Blandón et al., 1998; Payán, 2011; Arias, 1991; Herrero & Stuckey, 2015).

Los grupos funcionales del estudio correspondieron a enterobacterias (bacilos o cocos Gramnegativos y oxidasa negativa) en las que se diferencian los coliformes fecales y los coliformes totales; mesófilos Grampositivos (cocos o bacilos Grampositivos); actinomicetos (bacilos o cocos

Grampositivos, filamentosos); mohos (eucariontes filamentosos); levaduras (eucariontes unicelulares) y bacterias ácido acéticas (bacilos Gramnegativos y oxidasa positiva) (Forbes, 2009). Para su identificación se inocularon 10 mL de cada muestra en 90 mL de caldo peptonado al 0,5% según la metodología descrita por Blandón et al., (1998) y se realizó una agitación de las muestras por dos horas en un shaker Lab-line Reciprocal a 180 rpm. Posteriormente, se realizaron diluciones hasta  $10^{-4}$  y se inocularon 0,1 mL de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  por triplicado, utilizando el método de goteo en placa y sembrado en estría en medios de cultivo específicos para cada uno de los grupos taxonómicos evaluados.

Los medios de cultivos utilizados correspondieron a agar MacConkey para enterobacterias y coliformes totales, agar chromocoult para coliformes fecales, agar GYC con etanol para bacterias ácido acéticas, agar Plate Count (PCA, por sus siglas en inglés) para mesófilos totales y Grampositivos, agar actinomyces para actinomicetos y agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) para mohos y levaduras (Blandón et al., 1998; Forbes, 2009). Para cada una de las muestras se realizó un sembrado por triplicado en los medios de cultivo seguida de incubación a  $32^{\circ}\text{C}$  por 48 horas con el objetivo de calcular las abundancias promedio de cada grupo taxonómico. Adicionalmente, se realizaron observaciones estereoscópicas en un estereoscopio Unico ZM-181HFT de las placas Petri con el fin de identificar los diferentes morfotipos presentes en cada muestra de cada sustrato y sometidos a tinciones de Gram para las bacterias y tinciones de lactofenol para mohos y levaduras. Posteriormente se hicieron observaciones en microscopio Unico G395PC, con el fin de identificar la morfología y forma de la pared celular; en el caso de los mohos se observaron tanto la morfología de los esporangios como la forma de las hifas, caracteres taxonómicos determinantes para su identificación (Figura 5).



*Figura 5. Colecta, inoculación, incubación y observación de muestras para análisis microbiológico de los dos sustratos de aguas residuales del lavado sometidas a fermentación prolongada (Foto 1. Colecta en tubos Falcon estériles de 50 mL de cada sustrato a los 0, 4, 8, 12 y 16 días de fermentación; Foto 2. Siembra de muestras en medios de cultivo; Foto 3. Incubación a  $32^{\circ}\text{C}$  de muestras sembradas; Foto 4. Estereoscopia; Foto 5. Microscopía).*

Una vez todos los morfotipos fueron aislados y clasificados por grupo funcional, se realizaron siembras para diferentes pruebas bioquímicas con el fin de reconocer la familia y el género al que pertenecía cada morfotipo. Para las enterobacterias, acetobacterias y mesófilos Grampositivos se realizaron las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa, indol, citrato – Simmons, SIM, reducción de nitratos, prueba de óxido/fermentación, prueba de rojo metilo, lactosa, prueba TSI y ureasa; cada uno por triplicado (Forbes, 2009). Mientras que, para las levaduras, se realizaron pruebas de TSI, ureasa, nitratos y lactosa; cada uno por triplicado. Los resultados de las pruebas bioquímicas se compararon con la literatura, tomando como base el libro de Diagnóstico Microbiológico de Forbes (2009) y se clasificaron según los resultados de las pruebas bioquímicas hechas por diversos autores. Por otro lado, la identificación de los mohos se hizo por medio de la observación microscópica, observando las diferentes partes del hongo para su clasificación (Forbes, 2009). Adicionalmente se realizó una cuantificación de la riqueza y de la abundancia de especies microbianas identificadas en las muestras de cada sustrato, con el objetivo de calcular el índice de diversidad de Shannon-Wiener (Ritchie, 1986). Finalmente se realizaron pruebas tipo T-test con los índices de diversidad y los valores de riqueza total en donde se compararon ambos sustratos para determinar si el método de lavado afectaba de manera significativa la diversidad y riqueza de microorganismos presentes.

### ***Evaluación del efecto bioherbicida de los ácidos orgánicos***

Una vez concluida la caracterización física, química y microbiológica de los dos sustratos se dio inicio a la etapa de evaluación en condiciones de casa de malla del efecto bioherbicida de los ácidos orgánicos que se producen durante procesos fermentativos prolongados de las aguas residuales del lavado del café. Para llevar a cabo esta evaluación se definió un diseño experimental de bloques completamente aleatorizados (5 bloques  $\times$  7 tratamientos) que respondiera al objetivo de tener 5 unidades experimentales por cada tratamiento que fueron establecidas a partir de una varianza de 60,36 asociada a la variable porcentaje de control, con una diferencia mínima aceptable del 12% para una confiabilidad mayor del 85%. Una vez las bandejas con los cespedones fueron dispuestas en la casa de malla se realizó la caracterización botánica de las arvenses a nivel de género y especie mediante observaciones visuales respaldadas por los descriptores morfológicos presentados en el libro “*Arvenses frecuentes en el cultivo del café en Colombia*” escrito por Salazar-Gutiérrez (2021) y publicado por Cenicafe (Figura 6). Cabe subrayar que para el

reconocimiento preciso de las especies de arvenses en cada una de las unidades experimentales durante se contó con el apoyo y experticia del Dr. Luis Fernando Salazar Gutiérrez, autor del libro anteriormente mencionado y quien fue asesor del presente proyecto de investigación.



Figura 6. Muestreo de arvenses en campo y disposición de las unidades experimentales en casa de malla (Foto 1. colecta de cespedones en bandejas plásticas de 1400 cm<sup>3</sup>; Foto 2. Distribución de las bandejas con cespedones dentro de la casa de malla según BCA de 5 Bloques x 7 Tratamientos; Foto 3. Crecimiento foliar de las arvenses en casa de malla; Foto 4. Caracterización botánica de las especies de arvenses).

Después de concluida la caracterización botánica de las especies de arvenses en cada una de las unidades experimentales, se realizó una poda a 5 cm de la superficie del suelo del cespedón seguida de riegos diarios para estimular un crecimiento vegetativo de las arvenses suficiente para la aplicación de los siete tratamientos correspondientes a: (1) filtrados fermentados de las mieles del Ecomill<sup>®</sup>, (2) filtrados fermentados de las aguas de la primera cabeza de lavado del tanque-tina<sup>®</sup>, (3) ácido acético al 20%, (4) ácido cítrico al 10%, (5) mezcla de ácido acético al 20% + ácido cítrico al 10% (6) herbicida glufosinato de amonio en dosis de 10 mL/Litro y (7) testigo absoluto sin aplicación.

Para el filtrado de cada uno de los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café (Tratamientos 1 y 2), se construyeron dos filtros con tubos PVC (Cloruro de Polivinilo) de 4 pulgadas, reductores de 0,5 pulgadas y una llave de paso; los cuales contenían dos materiales inertes filtrantes correspondientes a 70% del volumen en gravilla y un 30% del volumen en arena lavada de río. Ambos filtros fueron llenados con las aguas residuales del lavado correspondientes a los dos sustratos y sometidos a decantación por gravedad durante 24 horas, tiempo en el cual se colectaban los filtrados que posteriormente eran sometidos a re-filtración a través de una malla Sarán de multifilamento de alta densidad (65%) de polietileno (Figura 7). Posterior al filtrado los sustratos fueron depositados en recipientes HDPE Sigma-Aldrich con capacidad de 1000 mL y conservados en refrigerador a 4°C hasta el momento de la aplicación foliar en casa de malla.

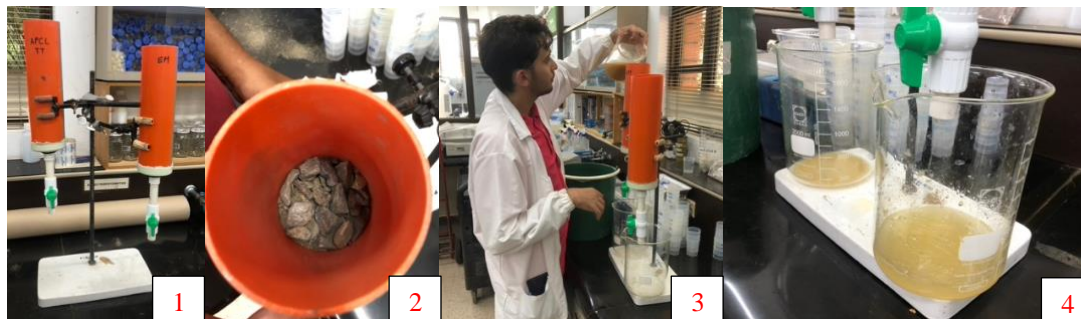


Figura 7. Filtrado de aguas residuales del lavado del café sometidas a fermentación aeróbica de 16 días (Foto 1. Filtros de PVC; Foto 2. Llenado de filtros con gravilla y arena lavada de río; Foto 3. Llenado de filtros con los dos sustratos; Foto 4. Decantación de filtrados por gravedad).

Las diluciones de ácido acético al 20%, ácido cítrico al 10% y la mezcla de ácido acético al 20% + ácido cítrico al 10%; correspondientes a los tratamientos 3, 4 y 5 se realizaron mediante dilución con agua destilada y agitación manual en un beaker de 1000 mL. Para la dilución del tratamiento de ácido acético al 20% se diluyeron 208 mL del ácido acético al 96% por litro de agua destilada, mientras que las diluciones para el tratamiento de ácido cítrico al 10% se diluyeron 100 gramos de monohidrato de ácido cítrico por litro de agua destilada teniendo en cuenta un peso molecular de 210 gramos por mol para obtener una concentración normal de 1N (Figura 8).

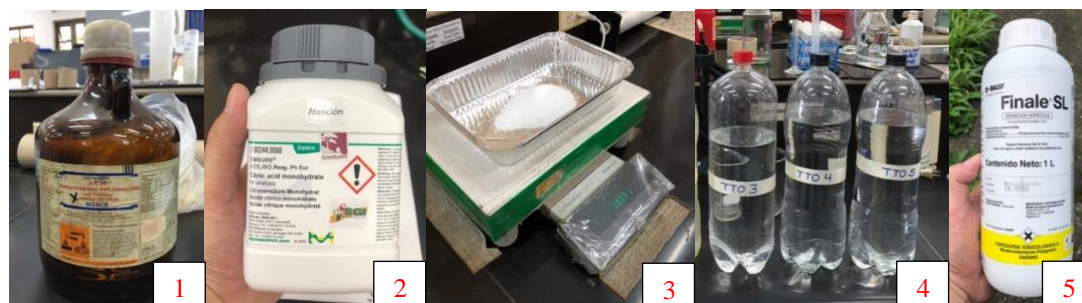


Figura 8. Diluciones, preparación de tratamientos de ácidos orgánicos y testigo comercial (Foto 1. Ácido acético al 96%; Foto 2. Monohidrato de ácido cítrico al 100%; Foto 3. Pesaje de Monohidrato de ácido cítrico previo a dilución; Foto 4. Envase de tratamientos; Foto 5. Glufosinato de amonio 150 gramos de I.A. por litro).

La segunda etapa de la investigación, se desarrolló en condiciones casa de malla y comenzó con la aplicación foliar de los tratamientos sobre las arvenses presentes en cada unidad experimental. Para este propósito, se utilizó un equipo de aspersión tipo bomba manual de espalda marca Royal Condor® con capacidad de 20 litros al cual se le adaptó una boquilla de abanico

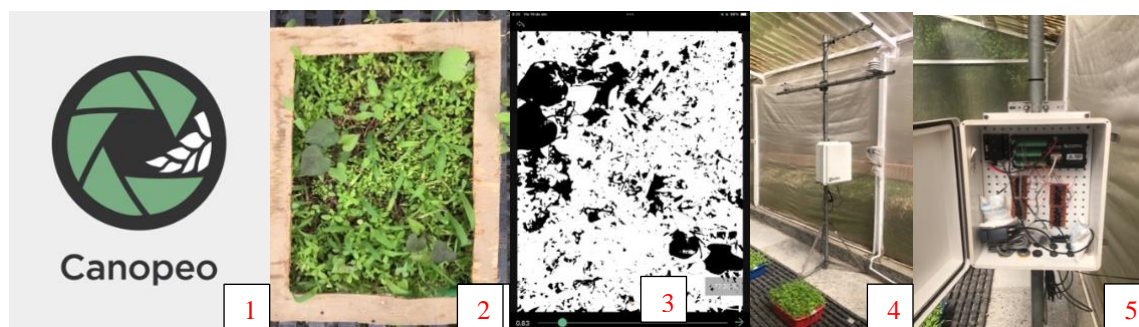
plano de baja descarga marca Teejet 8001-VS con regular de presión regulador CF-Valve de presión constante de 0,145 MPa (aproximadamente 21 PSI - libras por pulgada cuadrada). Para lograr una distribución uniforme de las gotas durante la aplicación se realizó previamente una calibración con agua limpia midiendo el tiempo de exposición de cada una de las bandejas; esta labor se realizó junto con el operario encargado de la labor contabilizando 2,7 segundos por bandeja para lograr la aspersión de un volumen de mezcla de 300L/ha, el cual es el recomendado para herbicidas postemergentes de contacto. Adicionalmente durante la calibración del equipo de aplicación se utilizaron hojas de papel Kraft para verificar la uniformidad de la aspersión de agua limpia. Los tratamientos fueron aplicados sobre las arvenses en etapa de crecimiento activo, una vez alcanzaron una altura de 10 cm sobre la superficie del suelo (Figura 9).



Figura 9. Equipos de aspersión y calibración de descarga (Foto 1. Bomba manual de espalda; Foto 2. Regulador de presión CF-Valve; Foto 3. Boquilla de abanico plano 8001; Foto 4. Calibración de uniformidad de aspersión; Foto 5. Aplicación de los tratamientos en cada unidad experimental).

Una vez realizada la aplicación foliar de los tratamientos sobre las arvenses, se iniciaron las mediciones en condiciones de casa de malla del porcentaje de control asociado a cada tratamiento y a los dos testigos (absoluto y relativo) mediante la estimación digital con la app Canopeo® y con la ayuda de un marco de madera de 57 cm<sup>2</sup>, de los porcentajes de cobertura verde fraccional del dosel de las especies de arvenses presentes en cada unidad experimental. Paralelamente se instaló en la casa de malla una estación meteorológica portátil marca Campbell Scientific® con Datalogger CR1000 y modem Raven para la transmisión automática de las variables temperatura mínima, media y máxima en Grados Celsius, Humedad Relativa en Porcentaje y Radiación Fotosintéticamente activa registradas durante el tiempo de evaluación

comprendido entre el 20 de febrero hasta el 20 de marzo de 2024. Estas mediciones con Canopeo® se realizaron a los 3, 7, 14 y 21 días después de la aplicación de cada uno de los tratamientos y los porcentajes registrados en cada una de estas mediciones fueron registrados en una base de datos Microsoft Excel® para su posterior análisis (Figura 10). Para determinar la persistencia del control asociada a cada tratamiento se estimó el número de días que transcurrieron desde la aplicación de los tratamientos hasta el momento en que las arvenses presentaban rebrotes con una altura superior a 15 cm.



*Figura 10. Estimación en casa de malla de los porcentajes de cobertura de los diferentes tratamientos con la app Canopeo® (Foto 1. Logo app Canopeo®; Foto 2. Marco de madera utilizado para el análisis de las imágenes; Foto 3. Estimación de porcentaje de cobertura verde por Canopeo®; Foto 4. Estación meteorológica portátil; Foto 5. Datalogger y modem para registro y transmisión de datos climáticos).*

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Posterior al proceso de recopilación, registro, organización y sistematización de la información colectada durante las dos etapas en las que se llevó a cabo la investigación, se utilizaron técnicas matemáticas y estadísticas para el análisis de la información con el objetivo de identificar comportamientos, relaciones, tendencias o patrones en las variables de respuesta y variables complementarias definidas previamente en la metodología. Durante la primera etapa correspondiente a la caracterización en condiciones de laboratorio de las aguas residuales del lavado del café, se realizó el análisis descriptivo de los cambios físicos, químicos y microbiológicos que se presentaron durante los procesos fermentativos prolongados de los dos sustratos correspondientes a las mieles del Ecomill® y a las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®. Mientras que para la segunda etapa en donde el alcance de la investigación viró a un tipo explicativo, el análisis estuvo soportado principalmente en pruebas estadísticas aplicadas a los datos experimentales de cada una de las variables de respuesta colectadas bajo condiciones semi-controladas en casa de malla.

### 4.1. Análisis físico de los sustratos de aguas residuales del lavado del café sometidos a fermentación aeróbica prolongada

Al determinar las diferencias relacionadas con la carga orgánica de los dos sustratos de aguas residuales del lavado se observó que los sólidos totales (ST) de las mieles del Ecomill® y de las aguas del Tanque Tina®, disminuyeron de manera significativa ( $p < 0,05$ ) a medida que el tiempo de fermentación avanzaba. En las mieles del Ecomill®, la carga orgánica representada en la concentración promedio de sólidos totales disminuyó de 26.000 mg/L registrados en el día 1, hasta 16.000 mg/L registrados en el día 16 de fermentación aeróbica; lo que indica una reducción del 38,46% de la carga orgánica (Figura 11). Estos resultados coinciden con los reportados por Robledo et al., (2013), en los que se demostró que la cantidad de sólidos totales presentes en aguas residuales agroindustriales disminuyó de manera significativa a medida que los procesos de fermentación avanzaban. Este comportamiento se atribuye principalmente a la transformación por parte de los microorganismos de los azúcares sólidos en ácidos orgánicos volátiles que no pueden ser cuantificados mediante el método termogravimétrico.

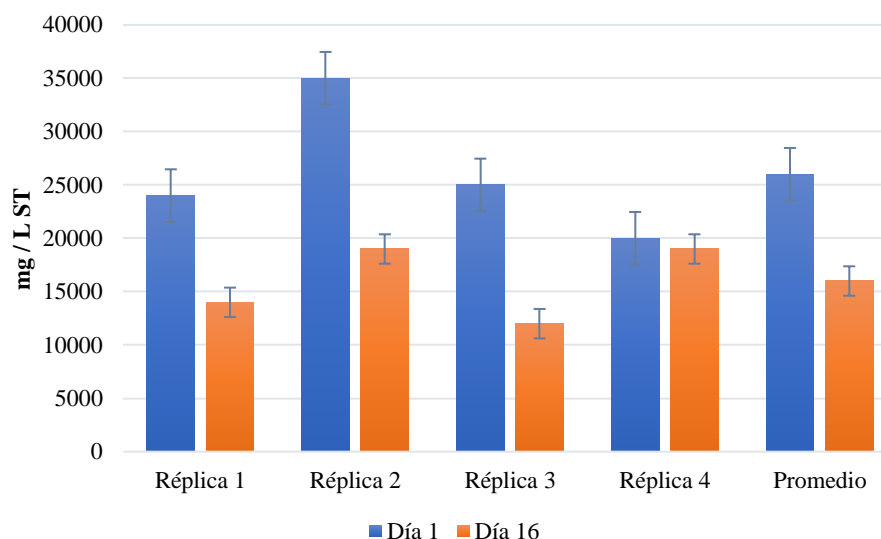


Figura 11. Concentración de sólidos totales en miligramos por litro de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Por su parte para el sustrato correspondiente a las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®, la concentración de sólidos totales disminuyó de 43.750 mg/L registrados en el día uno, hasta 32.000 mg/L registrados en el día 16 del proceso de fermentación aeróbica; lo que representa una disminución del 26.86% (Figura 12). Cabe resaltar que según estos análisis, la carga orgánica de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® determinada al final del proceso fermentativo de 16 días en condiciones anaeróbicas fue 49% mayor que la carga orgánica obtenida para las mieles del Ecomill®; esto se explica aduciendo que el volumen de agua utilizada comercialmente para el lavado de la semilla de café en el Ecomill® LH300 de la unidad de beneficio de Cenicafé, puede ser casi el doble del volumen de agua utilizado durante el primer enjuague del Tanque Tina®. Condición que se fundamenta en que la semilla certificada de café requiere de una alta limpieza que permita lograr el color ámbar característico del pergamino, para lo cual se deben remover con agua limpia todos los residuos de mucílago presentes en la superficie del endocarpio.

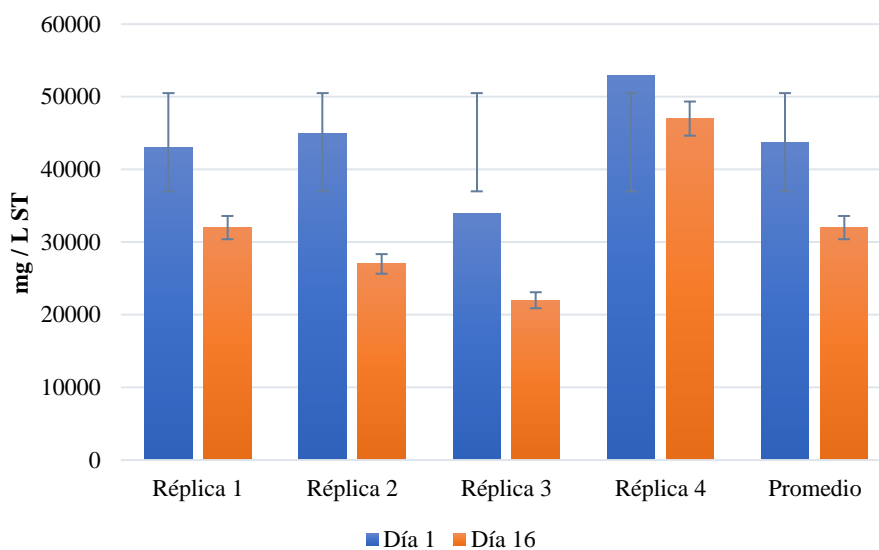


Figura 12. Concentración de sólidos totales en miligramos por litro de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Posterior a la determinación de las concentraciones de sólidos totales (mg/L) de ambos sustratos sometidos a 16 días de fermentación, se realizó la transformación de los datos a unidades de DQO (Demanda Química de Oxígeno) siguiendo la metodología descrita por Rodríguez et al., (2015), en donde al multiplicar la concentración de ST por una constante de 1,2, se obtiene la concentración en mg/L de DQO. La DQO es la medida de unidad de contaminación de aguas más frecuentemente usada internacionalmente, ya que equivale a la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar químicamente la materia orgánica presente en las aguas residuales, en donde a mayor DQO, mayor es la contaminación.

En las mieles del Ecomill®, la concentración promedio de DQO disminuyó de 31.200 mg/L registrados en el día uno hasta 19.200 mg/L registrados en el día 16 de fermentación aeróbica (Figura 13), mientras que para el sustrato correspondiente a las aguas primera cabeza de lavado del Tanque Tina®, la concentración promedio de DQO disminuyó de 52.500 mg/L registrados en el día 1 hasta 38.400 mg/L registrados en el día 16 de fermentación aeróbica (Figura 14).

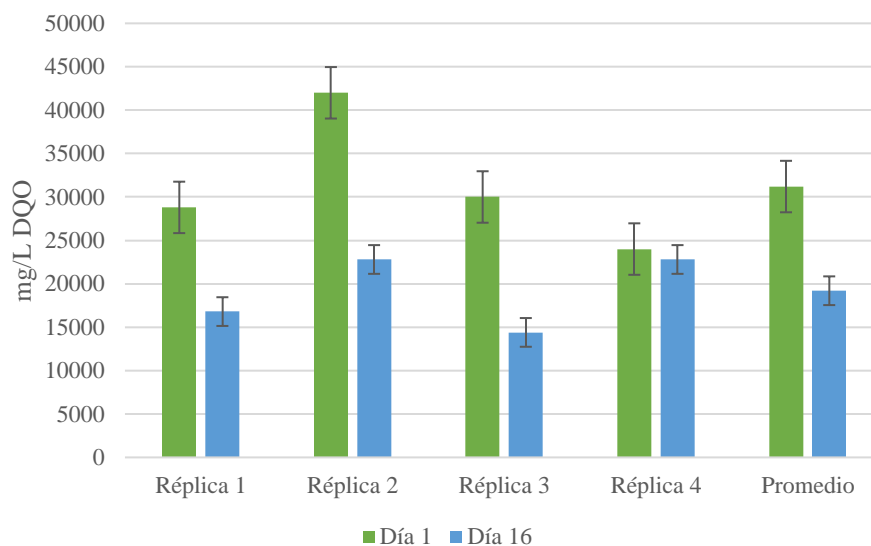


Figura 13. Concentración de DQO en miligramos por litro de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica.

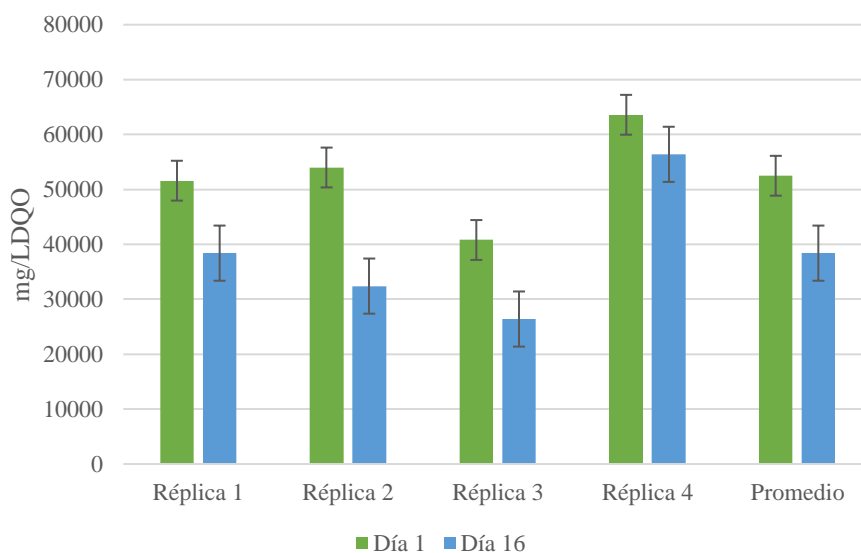


Figura 14. Concentración de DQO en miligramos por litro de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica.

La importancia de conocer tanto las concentraciones de los sólidos totales presentes en los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café, como las variaciones en la carga orgánica de ambos sustratos a través de 16 días de fermentación, radica en la estrecha relación que tienen los contenidos de materia seca de estos subproductos con la cantidad de azúcares reductores que son

la materia prima para los microorganismos precursores de la síntesis de ácidos orgánicos reportados por su acción bioherbicida.

Según Rodríguez en 2023, la materia seca presente en el mucílago fresco de café representa entre el 9,60 y el 11,49% de su peso total, lo cual equivale a una concentración de sólidos totales entre 96.000 a 114.000 mg/L. Teniendo en cuenta que los azúcares totales presentes en el mucílago representan entre el 61,23 y 70,48% de la materia seca, los contenidos de azúcares totales presentes en un mucílago de café con una carga orgánica de 105.000 mg/L de materia seca representan alrededor de 69.148 mg/L (Rodríguez, 2023).

En términos de la DQO, los estudios realizados por Rodríguez en 2015 reportan para un litro de mucílago fresco (sin fermentar) una concentración de 161.000 mg/L de DQO, lo cual equivale a 24 gramos de DQO por cada kilogramo de fruto y una relación DQO/ST para el mucílago sin fermentar de 1,6. Mientras que para el caso de las aguas residuales del café provenientes de un proceso de beneficio ecológico en el tanque tina, la DQO promedio fue de 27.500 mg/L y la relación DQO/ST en el agua residual es 1,2 (Rodríguez et al., 2015).

Teniendo como referencia los datos anteriores se puede inferir que la concentración de azúcares reductores presentes en las muestras fermentadas de las mieles provenientes del Ecomill® fue menor a la concentración de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®; condición que será correlacionada en función de las concentraciones de ácidos orgánicos determinadas por cromatografía líquida.

#### **4.2. Análisis químico de los sustratos de aguas residuales del lavado del café sometidos a fermentación aeróbica prolongada**

Al analizar el comportamiento a escala diaria del pH de ambos sustratos colectados aleatoriamente durante cinco semanas correspondientes a las cinco réplicas, se evidenció una disminución progresiva de los valores registrados a medida que el tiempo de fermentación transcurrió. Esta respuesta puede ser atribuida a la síntesis progresiva de metabolitos secundarios como ácidos orgánicos que disminuyeron el pH del medio; este comportamiento coincide con lo reportado por Carbonero en 1975. En el sustrato correspondiente a las mieles de Ecomill®, el pH inicial que registró valores promedio de 4,00 unidades, disminuyó durante los primeros siete días de fermentación aeróbica hasta alcanzar valores promedio de 3,50 unidades; las cuales se

mantuvieron relativamente constantes a medida que transcurrió el proceso fermentativo hasta los 16 días (Figura 15).

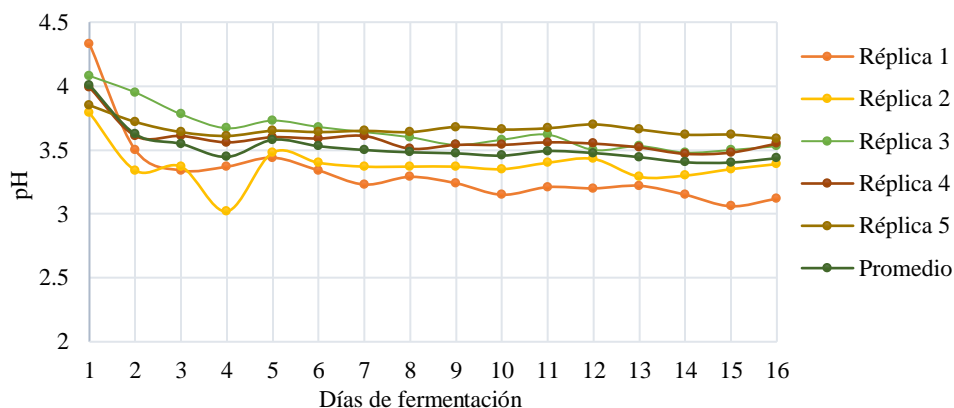


Figura 15. Comportamiento del pH de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Por su parte en el sustrato correspondiente a las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®, el pH inicial que registró valores promedio de 3,81 unidades de pH, disminuyó durante los primeros siete días de fermentación aeróbica hasta alcanzar valores promedio de 3,65 unidades; valor que se comportó relativamente constante lo largo del tiempo de fermentación hasta los 16 días (Figura 16).

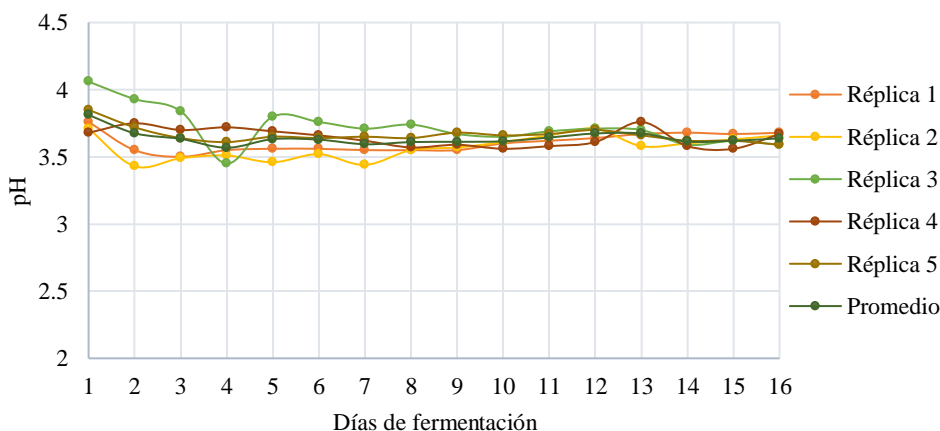


Figura 16. Comportamiento del pH de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Las diferencias comparativas en cuanto al comportamiento del pH registrado en los dos sustratos se atribuyen principalmente a sus diferencias en la carga orgánica determinada previamente en el análisis de los sólidos totales, las cuales muestran una alta variabilidad entre réplicas. La mayor carga orgánica de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® indica una mayor concentración de azúcares reductores que son la materia prima para la síntesis de ácidos orgánicos mediada por microorganismos; condición precursora de la disminución acelerada del pH hasta el octavo día de fermentación aeróbica seguida de la estabilización del mismo entre el día 8 y el día 16.

Estos resultados coinciden con los hallazgos de Córdoba & Guerrero en 2016, quienes al evaluar los procesos de fermentación del café en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, demostraron bajo condiciones de fermentación aerobia que el pH de la masa de café tiende a disminuir desde valores de pH de 5,5 en el momento inicial hasta valores más ácidos de pH con 4,4. Afirmando que la síntesis de ácidos orgánicos como el ácido cítrico y acético generados durante fermentaciones aerobias del café, propician dichas disminuciones en los valores de pH.

Es importante destacar que los valores iniciales de pH de las muestras colectadas del agua del Tanque Tina® son ligeramente más ácidas ( $\text{pH } \bar{x} = 3,8$ ) respecto a las mieles del Ecomill® ( $\text{pH } \bar{x} = 4,0$ ); esto puede estar asociado a una mayor concentración de azúcares reductores presentes en este sustrato que dan origen a una mayor cantidad de ácidos orgánicos que acidulan el pH. Las características particulares de los tanques de fermentación pueden también tener cierta influencia sobre la cantidad de oxígeno presente durante el proceso fermentativo del mucílago, lo cual es consistente con lo reportado por Oliveros et al., (2014) quienes encontraron menores concentraciones de oxígeno en los tanques de fermentación del Ecomill® respecto al Tanque Tina®; condición anaeróbica que propicia una mayor síntesis de alcoholes y menor de ácidos orgánicos incrementando los valores iniciales de pH en las mieles del Ecomill®.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en los valores de pH de las mieles del Ecomill® y las aguas del Tanque Tina® ( $\text{Pr} < 0,01$ ), demostrando que el método de lavado incide directamente sobre el pH inicial registrado de ambos sustratos, así como en los valores de pH registrados entre los 8 y 16 días de fermentación. Esto puede ser explicado por las diferencias en el volumen de agua utilizada durante el lavado con ambos sistemas, que, al incidir sobre la concentración de sólidos totales de ambos sustratos, incide significativamente sobre la abundancia

de microorganismos que actúan como precursores de las síntesis de ácidos orgánicos en las aguas residuales del lavado del café.

Para medir la concentración de ácidos solubles presentes en cada uno de los sustratos de aguas residuales, se realizaron determinaciones de la acidez titulable (AT) y de sus variaciones a lo largo del proceso fermentativo, en donde a medida que aumentaba la cantidad de hidróxido de Sodio (NaOH) necesario para llevar hasta un pH básico a las aguas residuales, significaba que mayor era la concentración de ácidos orgánicos disueltos que contrarrestan la cantidad de hidrogeniones ( $\text{OH}^-$ ) agregados al medio (Yúfera, 1996).

Se observó que la acidez titulable (AT) aumentaba constantemente a medida que avanzaba el tiempo de fermentación tanto en las aguas del Tanque Tina® como en las mieles del Ecomill®, lo que indica una síntesis gradual de los ácidos orgánicos mediada por microorganismos. En las mieles del Ecomill®, la acidez titulable promedio registrada el día uno fue de 0,70 mL de NaOH, aumentando hasta valores máximos de 2,41 mL de NaOH. Sin embargo, se observó una amplia variabilidad de estos valores registrados en algunas réplicas alcanzando estimaciones máximas de 3,25 mL de NaOH, respuesta que puede atribuirse a las diferencias en la riqueza y la abundancia de microorganismos precursores de la síntesis de ácidos orgánicos presentes en este sustrato, condición que se ve reflejada en la alta acidez titulable del medio (Figura 17).

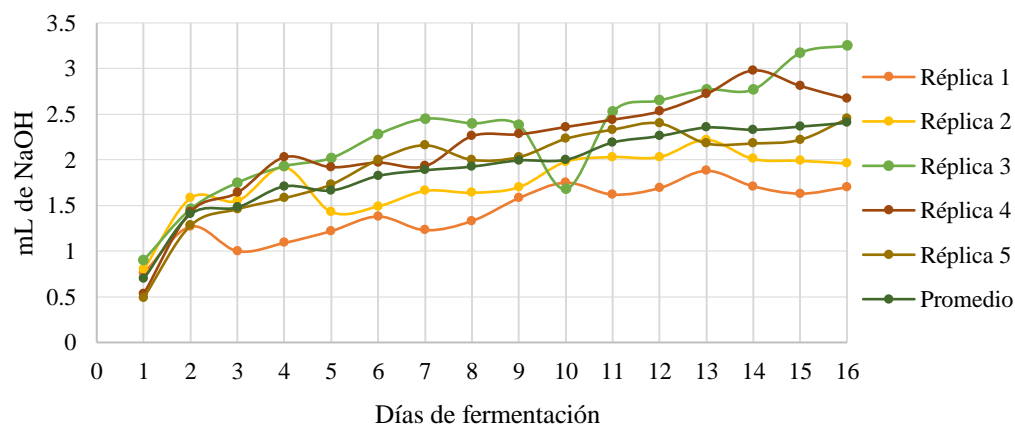


Figura 17. Comportamiento de la acidez titulable en mL de NaOH de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Este comportamiento coincide con las observaciones realizadas por Puerta & Ríos (2014), que reportan un aumento de la AT a medida que avanza el tiempo de fermentación hasta las 72

horas, en donde a las 20 horas de fermentación se habían triplicado los valores iniciales reportados para esta variable. Lo que indicó que los microorganismos fermentaban rápidamente los azúcares presentes en el mucílago. En las determinaciones realizadas en las mieles del Ecomill®, se registró un incremento exponencial en las primeras 24 horas del proceso de fermentación, pasando de valores promedio de 0,70 mL de NaOH a valores promedio de 1,40 mL de NaOH a las 24 horas de fermentación.

Se observó además que los datos promedio registrados para la AT de las mieles del Ecomill® se ajustan a una curva de tendencia logarítmica ( $R^2 = 0,966$ ), indicando que hay una tasa de crecimiento constante en los valores de la acidez titulable desde el día 2 hasta el día 13, momento en el cual se observa una tendencia de estabilización de los valores de la acidez titulable, manteniendo valores promedio de 2,35 mL de NaOH. Esto indica que el tiempo mínimo de fermentación aeróbica requerido por los microorganismos presentes en las mieles del Ecomill® para sintetizar los azúcares reductores que dan origen a la mayor concentración de ácidos orgánicos solubles fue de 13 días a temperatura ambiente (Figura 18).

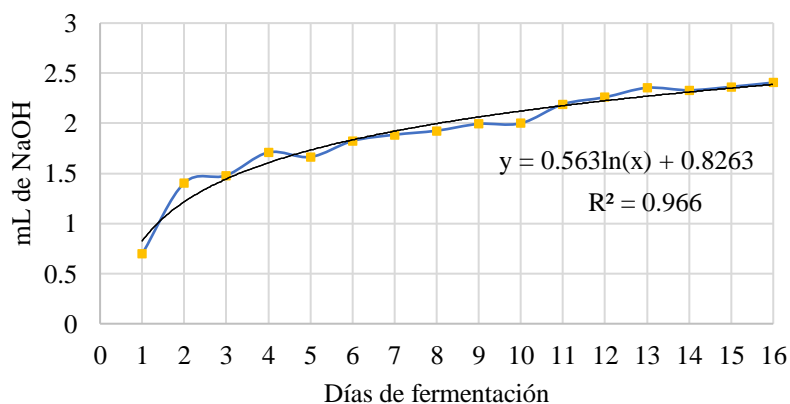


Figura 18. *Tendencia logarítmica de los valores registrados de acidez titulable en mL de NaOH en las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica.*

En el sustrato correspondiente a las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® se observó un comportamiento similar de la acidez titulable a medida que transcurrió el tiempo de fermentación, registrando valores promedio en el día uno de 0,78 mL de NaOH hasta valores de 3,26 mL de NaOH al día 13 de fermentación (Figura 19). De igual forma se observó una alta variabilidad en los valores registrados de AT en las cinco réplicas, condición que puede ser atribuida a las diferentes concentraciones de la carga orgánica reportadas en el análisis de los

sólidos totales para este sustrato, las cuales a su vez inciden directamente sobre la actividad y abundancia de los microorganismos precursores de la síntesis de ácidos orgánicos solubles.

Al igual que en las mieles del Ecomill®, se evidenció un aumento exponencial de la AT durante las primeras 24 horas del proceso, pasando de valores de 0,78 mL de NaOH en promedio hasta valores de 1,60 mL de NaOH 24 horas de fermentación, valores que siguieron aumentando logarítmicamente hasta el día 14 de fermentación en donde tendieron a estabilizarse de la misma manera que ocurrió con las mieles del Ecomill®

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en los valores de la acidez titulable entre los dos sustratos ( $p < 0,0001$ ), demostrando que el método de lavado del café afecta directa y significativamente la cantidad de azúcares y por ende la cantidad de ácidos orgánicos solubles presentes en el medio; en donde se evidencia una mayor acidez titulable en las aguas del primer enjuague del Tanque Tina® que en las mieles del Ecomill®.

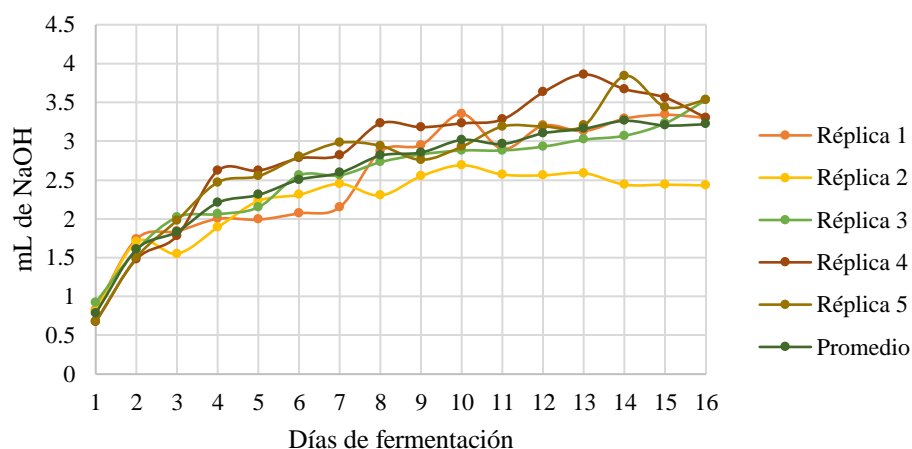


Figura 19. Comportamiento de la acidez titulable en mL de NaOH de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Se observó además que los datos promedio, mostraron una tendencia logarítmica ( $R^2 = 0,9899$ ), indicando una tasa de crecimiento constante en los valores de la acidez titulable desde el día 2 hasta el día 14 de fermentación, momento en el cual se observa una tendencia de estabilización de los valores de la acidez titulable, manteniendo valores promedio de 3,25 mL de NaOH (Figura 20).

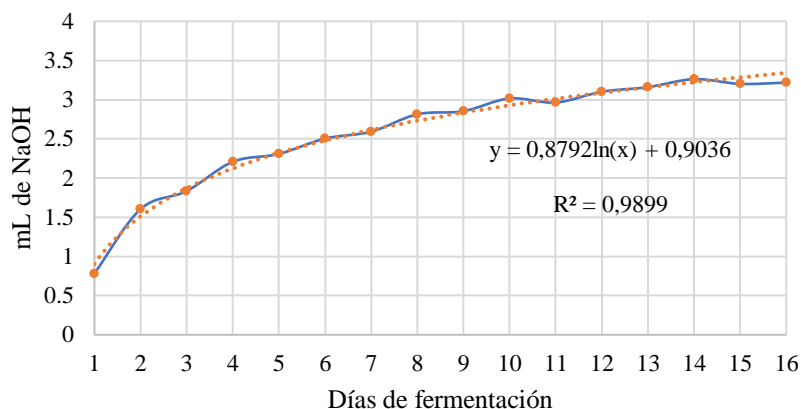


Figura 20. Tendencia logarítmica de los valores registrados de acidez titulable en ml de NaOH en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Para expresar la acidez titulable de ambos sustratos en la unidad internacional (mg CaCO<sub>3</sub>/L) se realizó una transformación de los datos mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez total como CaCO}_3 \text{ en mg /L} = \frac{[(A \times B) (50) (1000)]}{100}$$

donde:

A es el volumen de NaOH utilizado en la titulación.

B es la molaridad de la disolución de NaOH equivalente a 4.

50 es el factor para convertir equivalentes/L a mg CaCO<sub>3</sub>/L.

1000 es el factor para convertir mL a L.

100 es el volumen de la muestra en mL.

En las mieles del Ecomill®, la acidez titulable promedio registrada el día uno fue de 1.392 mg de CaCO<sub>3</sub> /L, aumentando hasta valores máximos de 4.908 mg de CaCO<sub>3</sub> /L en el día 16 de la fermentación (Figura 21), mostrando un aumento exponencial de la AT durante las primeras 24 horas del proceso, pasando de valores promedio de 1.392 mg de CaCO<sub>3</sub>/L en promedio hasta valores de 2.808 mg de CaCO<sub>3</sub>/L a las 24 horas de fermentación; valores que siguieron aumentando logarítmicamente hasta el día 16 de fermentación.

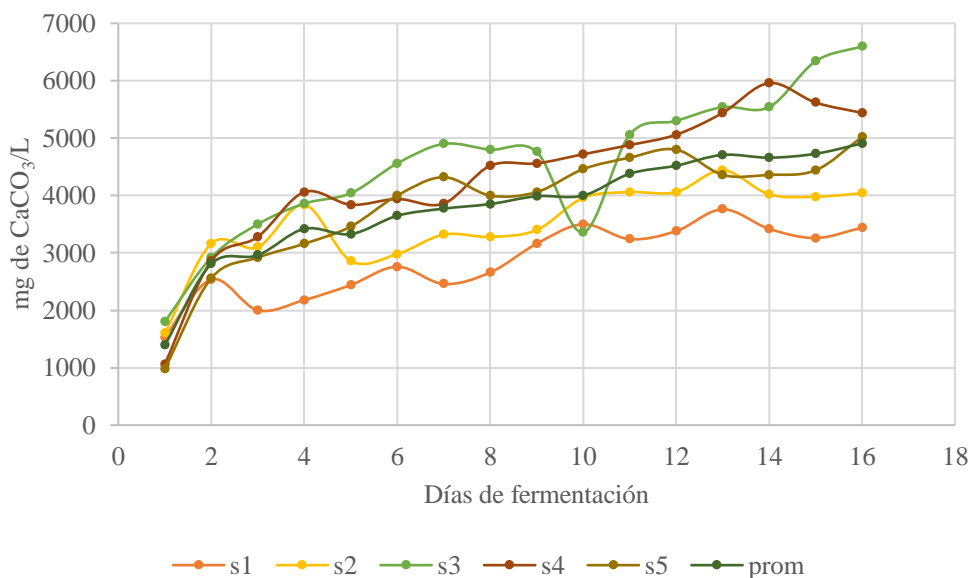


Figura 21. Comportamiento de la acidez titulable en mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Por su parte en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® la acidez titulable promedio registrada el día uno fue de 1.604 mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , aumentando hasta valores máximos de 6.311 mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  en el día 16 de la fermentación (Figura 22), mostrando un aumento exponencial de la AT durante las primeras 24 horas del proceso, pasando de valores promedio de 1.604 mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  en promedio hasta valores de 3.249 mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  a las 24 horas de fermentación; valores que siguieron aumentando logarítmicamente hasta el día 15 de fermentación (Figura 22).

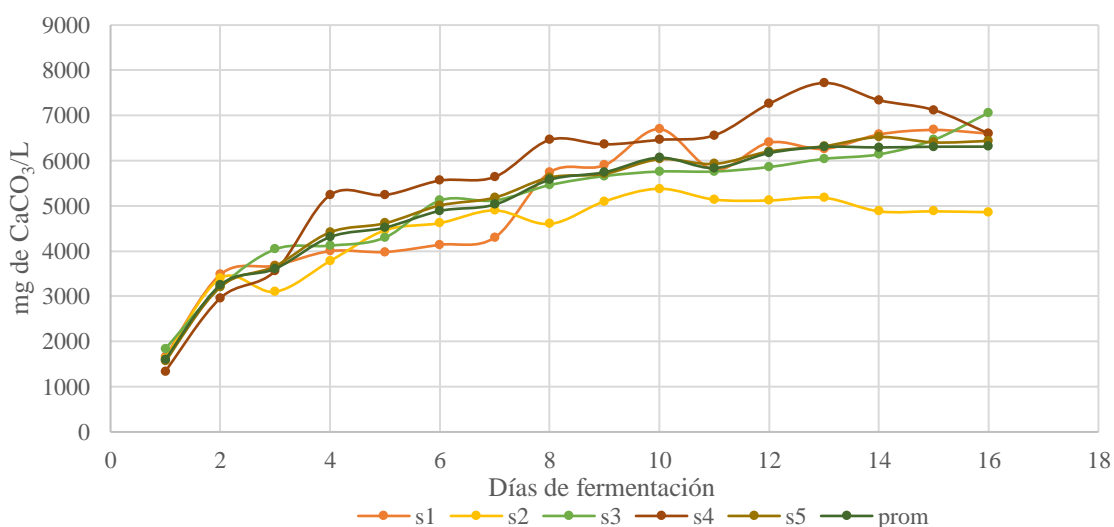


Figura 22. Comportamiento de la acidez titulable en mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica.

La cuantificación de las variaciones en la concentración de los tres ácidos reportados por su acción bioherbicida (ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico) a través de los 16 días de fermentación de los dos sustratos de aguas residuales del lavado se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida (HPLC). Para el sustrato correspondiente a las mieles del Ecomill®, la concentración promedio de ácido acético aumentó de 1,55 g/L en el día 0 hasta valores máximos de 2,65 g/L registrados en el día 8 de fermentación; momento en el cual inició una disminución progresiva de la concentración de dicho ácido hasta alcanzar valores de 2,09 g/L al día 16. Por su parte la concentración promedio de ácido cítrico aumentó de 0,19 g/L en el día 0 hasta valores máximos de 0,25 g/L registrados en el día 16 de fermentación, mientras que la concentración promedio de ácido láctico aumentó de 0,37 g/L en el día 0 hasta valores máximos de 0,78 g/L registrados en el día 12 de fermentación; momento en el cual inició una disminución de la concentración de dicho ácido hasta alcanzar valores de 0,72 g/L al día 16 (Figura 23).

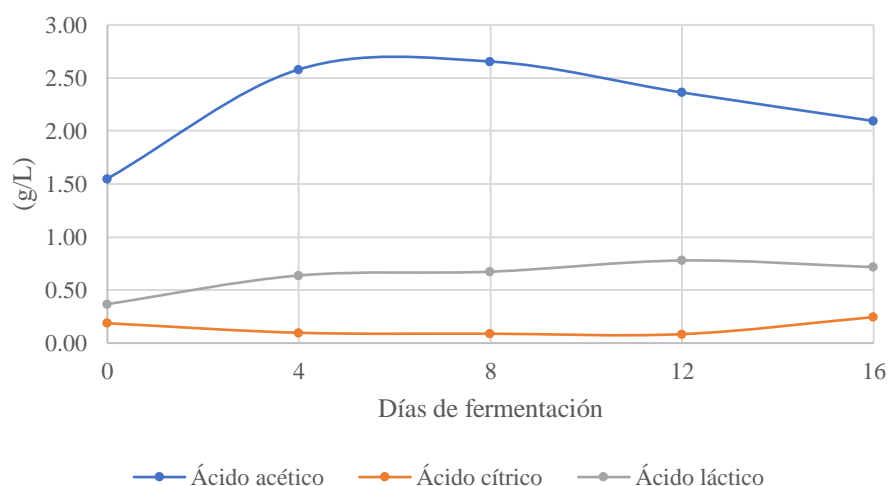


Figura 23. Cambios en las concentraciones de ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico en (g/L) de las mieles del Ecomill® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Para el sustrato correspondiente a las aguas de primera cabeza del Tanque Tina®, la concentración promedio de ácido acético aumentó de 2,94 g/L en el día 0 hasta valores máximos de 6,21 g/L registrados en el día 16 de fermentación. Por su parte la concentración promedio de ácido cítrico disminuyó de 0,33 g/L en el día 0 hasta valores máximos de 0,04 g/L registrados en el día 12 de fermentación, momento en el cual inició estabilización de la concentración de dicho ácido en valores de 0,04 g/L al día 16. En cuanto a la concentración promedio de ácido láctico

aumentó de 0,40 g/L en el día 0 hasta valores máximos de 0,74 g/L registrados en el día 16 (Figura 24).

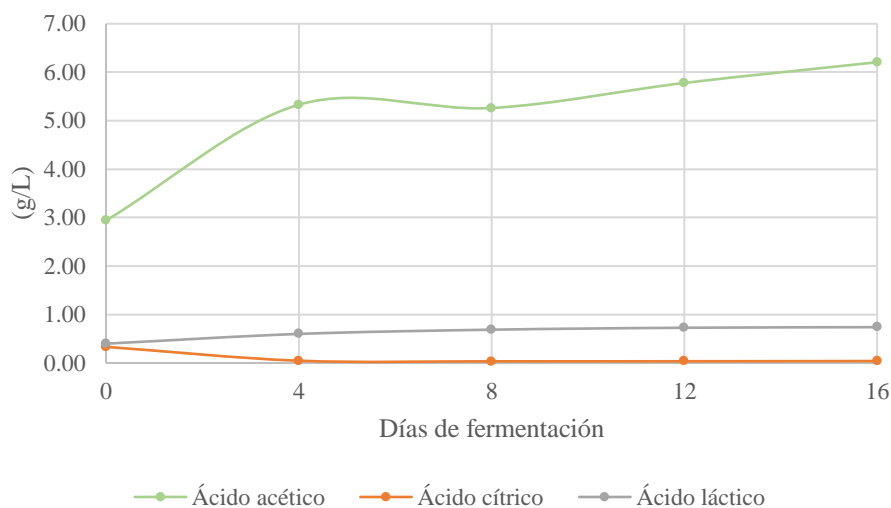


Figura 24. Cambios en las concentraciones de ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico en (g/L) de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® durante 16 días de fermentación aeróbica.

Para comprender de forma más dinámica los cambios en las concentraciones de los ácidos orgánicos que se producen durante la fermentación prolongada de los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café se construyeron dos mapas de calor (Heatmap) en donde los valores cercanos a -1 correspondientes al color azul-morado indican menores concentraciones, los valores cercanos a 0 correspondientes al color verde indican concentraciones intermedias y los valores cercanos a 1 correspondiente al color amarillo indican las mayores concentraciones de los ácidos evaluados. Teniendo en cuenta este tipo de análisis jerárquico representado en los mapas de calor, se resalta que las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® presentan con mayor frecuencia, concentraciones más altas de ácido acético entre los días 4 y 16 del proceso fermentativo en comparación con las concentraciones registradas de este ácido para las mieles del Ecomill®; mientras que para el ácido láctico se observó una tendencia similar en las concentraciones registradas en los dos sustratos a través del tiempo de fermentación.

Cabe subrayar que las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® presentan con mayor frecuencia, concentraciones más bajas de ácido cítrico entre los días 0 y 4 del proceso fermentativo, momento en el cual las concentraciones mostraron una tendencia a las estabilización a través del tiempo de fermentación, mientras que para las mieles del Ecomill® se presentaron las mayores concentraciones entre el día 4 y 12 de fermentación seguida de una ligera disminución de la concentración entre los días 12 y 16 de fermentación (Figura 25).

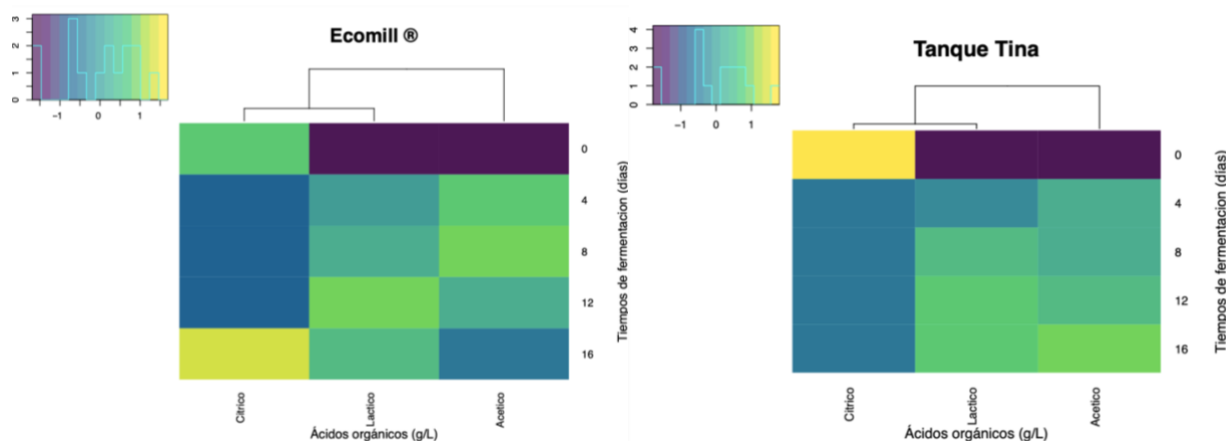


Figura 25. Mapas de calor (*Heatmap*) de las concentraciones de ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico en (g/L) de los dos sustratos de aguas residuales del lavado del café sometidas a 16 días de fermentación aeróbica.

En el anterior *Heatmap*, la representación cromática de los valores se rige por una escala de colores en la que los tonos asignados a cada celda dependen del valor numérico correspondiente a cada uno de los tiempos de fermentación (0, 4, 8, 12 y 16 días). En este caso, la escala está configurada de manera que las concentraciones más bajas de los tres ácidos orgánicos (acético, cítrico y láctico) se asocian a colores más oscuros (púrpura, azul y verde oscuro), mientras que las concentraciones más altas de los ácidos orgánicos se representan con colores más claros (verde claro y amarillo). Esta asignación se logra mediante una función de mapeo que transforma los valores numéricos en una escala continua de color, donde la intensidad lumínica aumenta proporcionalmente con el valor.

Los perfiles cromatográficos de los tres ácidos orgánicos analizados para los dos sustratos, permitieron analizar comparativamente la composición de las muestras en función de la absorbancia (AU) de los compuestos en relación a los tiempos de retención identificados a 210 nm; decir los tiempos en minutos (min) en que migraron de la columna cromatográfica. Para las muestras analizadas de las mieles del Ecomill® el tiempo promedio de retención para el ácido cítrico fue de 11,47 minutos, para el ácido láctico de 16,67 minutos y para el ácido acético de 19,62 minutos (Figura 26).

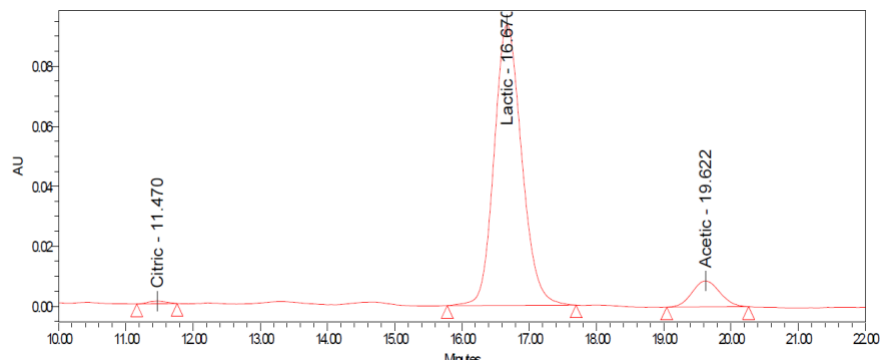


Figura 26. Perfil cromatográfico de muestras de Ecomill, correspondiente a la identificación de ácidos orgánicos a 210 nm: ácido cítrico (11,47 min), ácido láctico (16,67 min) y ácido acético a 19,62 min.

Mientras que para las muestras analizadas de las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® el tiempo promedio de retención para el ácido cítrico fue de 11,60 minutos, para el ácido láctico de 16,73 minutos y para el ácido acético de 19,76 minutos (Figura 27).

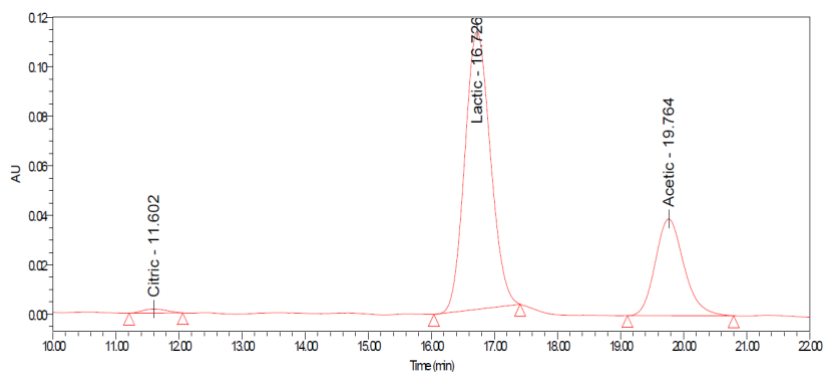


Figura 27. Perfil cromatográfico de muestras del tanque tina de los ácidos orgánicos identificados a 210 nm: ácido cítrico (11,60 min), ácido láctico (16,73 min) y ácido acético a 19,76 min.

#### 4.3. Análisis microbiológico de los sustratos de aguas residuales del lavado del café sometidos a fermentación aeróbica prolongada

Durante el análisis de la microbiota asociada a la fermentación prolongada de aguas residuales del lavado del café, se observaron 25 diferentes morfotipos cultivables en las mieles del Ecomill®, siendo las actinobacterias con siete diferentes morfotipos, el grupo funcional más representativo (28%), seguido de las levaduras con cinco morfotipos (20%) y los mesófilos Grampositivos con cinco morfotipos (20%). Al analizar la riqueza en relación a los diferentes grupos funcionales

identificados en las mieles del Ecomill® se destacan cuatro diferentes especies de acetobacterias, representando el 16% del total de las especies y dos especies para los coliformes totales y los mohos, siendo los grupos taxonómicos con el menor número de especies presentes, representando cada uno un 8% de las especies totales (Figura 28).

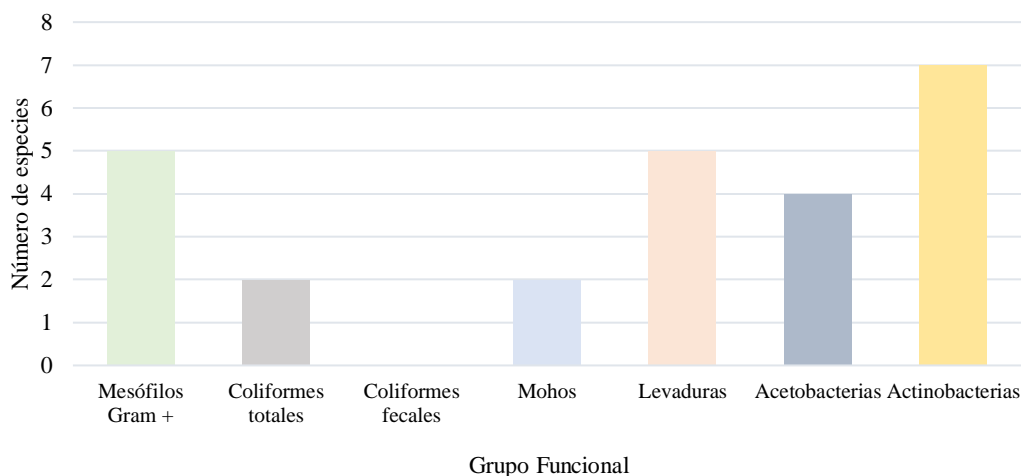


Figura 28. Riqueza en número de especies identificadas por grupo funcional en las mieles del Ecomill®.

Estas observaciones concuerdan con los estudios realizados por Puerta et al., (2012) quienes reportaron en análisis microbiológicos del mucílago de café, un recuento mayor de mesófilos Grampositivos como *Lactobacillus* spp. y levaduras, respecto a otras especies microbianas pertenecientes a otros grupos funcionales. El estudio reporta que el recuento de coliformes fue significativamente más bajo mostrando una tendencia a disminuir a medida que avanzaba el proceso de fermentación a causa de la acidez del medio. Según Murray et al., (2017), las bacterias coliformes prosperan en un pH neutro-alcalino, teniendo generalmente un rango óptimo de crecimiento entre 6,0 y 8,0 en la mayoría de especies de la familia Enterobacteriaceae. Esto explica en gran medida la baja diversidad de coliformes encontrados en las mieles del Ecomill®, ya que el pH inicial de las mieles del medio estuvo alrededor de 4,01 observándose una tendencia a disminuir en el tiempo a causa de la síntesis de ácidos orgánicos hasta valores de 3,43; condición que muy probablemente inhibió la colonización de estas especies.

Se observó además que en la mayoría de grupos funcionales la riqueza de especies tuvo una tendencia a disminuir a medida que avanzó el proceso fermentativo, ya que la disminución en el pH y el aumento de la concentración de ácidos orgánicos del medio son condiciones en la que no

pueden proliferar ciertas especies de microorganismos. En cinco de los seis grupos funcionales identificados, se observó una disminución en la riqueza de especies a partir del día ocho del proceso de fermentación, cabe resaltar que durante el análisis no se encontraron coliformes fecales presentes en el medio, demostrando buenas prácticas en el beneficio del café y una alta calidad del agua de lavado. Puerta et al., (2012), reportaron la presencia de coliformes totales como *Escherichia coli* en el mucílago del café, pero con una baja abundancia que tiende a disminuir a medida que el pH se acidifica. Coronell & Herrera (2022) también reportaron *Escherichia coli* en el mucílago de café, sin embargo, esta especie representó menos del 5% de las especies totales, lo que demuestra que las características particulares del medio no fueron favorables para la proliferación de este tipo de microorganismos.

Un hallazgo relevante fue la ausencia de mohos en el medio después del día 12 del proceso de fermentación, estos microorganismos pueden actuar activamente en la producción de ácido cítrico, destacándose los géneros *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. (Show et al., 2015). Dado que los mohos compiten directamente por los nutrientes presentes en el medio con las bacterias y levaduras, se puede generar una limitación en los nichos disponibles para su desarrollo. Por otro lado, se ha reportado que algunas especies de actinomicetos pueden tener capacidad antagonista ante algunos mohos, generando compuestos fungicidas que afectan los procesos metabólicos de los mohos o dañando su pared celular (Torres-Rodríguez et al., 2024), lo que podría explicar la tendencia a desaparecer este grupo taxonómico en este medio. En el caso de los mesófilos Grampositivos y actinomicetos se observó una reducción en la riqueza de especies, disminuyendo ostensiblemente después del día 8 de la fermentación (Figura 29).

Es importante resaltar que la riqueza de especies de acetobacterias no fue afectada a medida que avanzó el proceso de fermentación dado que es grupo funcional que participa en mayor medida en la síntesis del ácido acético, condición que no se ve afectada por la disminución en los valores de pH ni por el incremento en la concentración de ácidos orgánicos durante el tiempo de las observaciones.

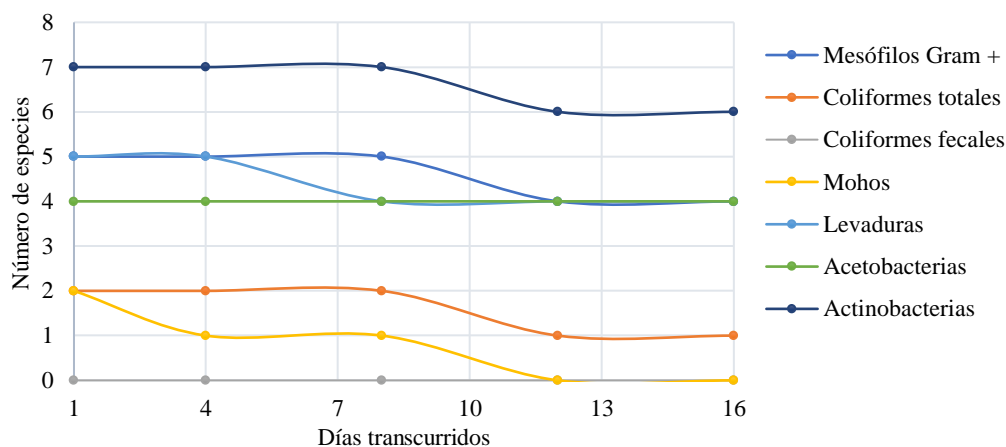


Figura 29. Variaciones en la riqueza de especies pertenecientes a los diferentes grupos funcionales identificados en las mieles del Ecomill® a lo largo de 16 días de fermentación aeróbica.

La abundancia de los grupos funcionales se vio afectada por los cambios reportados previamente en las variables fisicoquímicas del medio. Las levaduras fueron el grupo funcional más representativo, mostrando mayores abundancias desde el inicio hasta el final del proceso fermentativo, registrando valores promedio cercanos a los  $500 \times 10^3$  UFC/mL. Los actinomicetos presentaron una alta abundancia al iniciar la fermentación y durante todo el proceso, registrando valores cercanos a los  $400 \times 10^3$  UFC/mL, en donde adicionalmente se observó un aumento de los mesófilos Grampositivos a medida que avanzaba el proceso de fermentación, pasando de  $100 \times 10^3$  UFC/mL en el día uno, hasta abundancias de  $487 \times 10^3$  UFC/mL a los 8 días del proceso fermentativo (Figura 30), comportamiento que puede ser atribuido a las disminuciones en el pH del medio, ya que al ser organismos acidófilos se ven favorecidos por la condición ácida que propicia su proliferación.

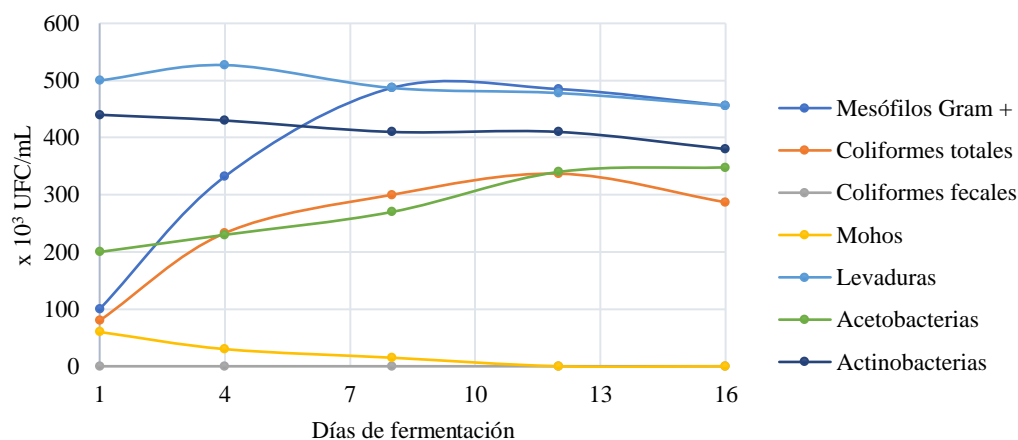


Figura 30. Variaciones en la abundancia de especies pertenecientes a los diferentes grupos funcionales identificados en las mieles del Ecomill® a lo largo de 16 días de fermentación aeróbica.

Los géneros de microorganismos identificados fueron previamente reportados Blandón et al. (1999) en la pulpa y el mucílago del café, quienes en encontraron especies como *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Mucor* spp., *Saccharomyces* spp., *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp. y *Candida* spp.; por su parte Puerta et al. (2015), reportaron géneros como *Lactobacillus* spp., *Acetobacter* spp. y *Enterobacter* spp. (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de microorganismos identificadas por grupo funcional en las mieles del Ecomill®

Grupo funcional	Género
Mesófilos Grampositivos	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus</i> sp.
	<i>Staphylococcus</i> sp.
	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Bacillus</i> sp.
Enterobacterias	<i>Enterobacter</i> sp.
	Enterobacteriaceae
Mohos	<i>Penicillium</i> sp.
	Mucoral
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Pichia</i> sp.
	<i>Candida</i> sp.
	<i>Torulasporea</i> sp.
	<i>Candida</i> sp.
Bacterias Acéticas	<i>Acetobacter aceti</i>
	<i>Acetobacter</i> sp.
	<i>Gluconobacter</i> sp.

	Acetobacteria
	<i>Micrococcus</i> sp.
	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Streptomyces</i> sp.
Actinomicetos	<i>Actinomyces</i> sp.
	<i>Actinomyces</i> sp.
	<i>Nocardia</i> sp.
	<i>Rhodococcus</i> sp.

La riqueza de especies presentes en las aguas residuales provenientes del Tanque Tina® presentó un comportamiento similar a la riqueza de especies encontrada en las mieles del Ecomill®. En este sustrato se identificaron en total 23 diferentes morfotipos cultivables, siendo las actinobacterias con siete diferentes morfotipos el grupo funcional más representativo (30% de las especies totales), seguido de las levaduras con cuatro morfotipos (18% de las especies totales) y los mesófilos Grampositivos con cuatro morfotipos (18% de las especies). Se identificaron dos diferentes especies de mohos, que representaron el 8% del total de las especies y dos especies para los coliformes totales (Figura 31).

Es relevante reportar la disimilitud en el número de especies presentes entre las mieles del Ecomill® y las aguas del Tanque Tina®, ya que en este último sustrato se observó un menor número de especies a pesar de haber sido el sustrato de mayor carga orgánica según el análisis de los sólidos totales. Estos resultados reafirman la idea de que los diferentes métodos de lavado de café afectan de manera significativa la riqueza de especies presentes en las aguas residuales ( $p < 0,0085$ ), disminuyendo el número de especies totales presentes durante todo el proceso de fermentación del mucílago de café.

Se observó además una disminución en el número de especies de mesófilos Grampositivos y de levaduras, presentando una especie menos de cada grupo funcional en las aguas del Tanque Tina®. Estos grupos funcionales son importantes actores del proceso de fermentación y degradación del mucílago, abriendo la posibilidad de que sea la cantidad de oxígeno presente en los tanques de fermentación, condición que afectó el número de especies identificadas, ya que estos microorganismos prosperan generalmente en condiciones más anaeróbicas, como las reportadas para los tanques de fermentación del Ecomill®. La mayor cantidad de oxígeno presente en el Tanque Tina® durante el proceso de fermentación, es una posible condición que haya incidido en las disminuciones en el número de individuos identificados y por consiguiente, el número de especies por grupo funcional.

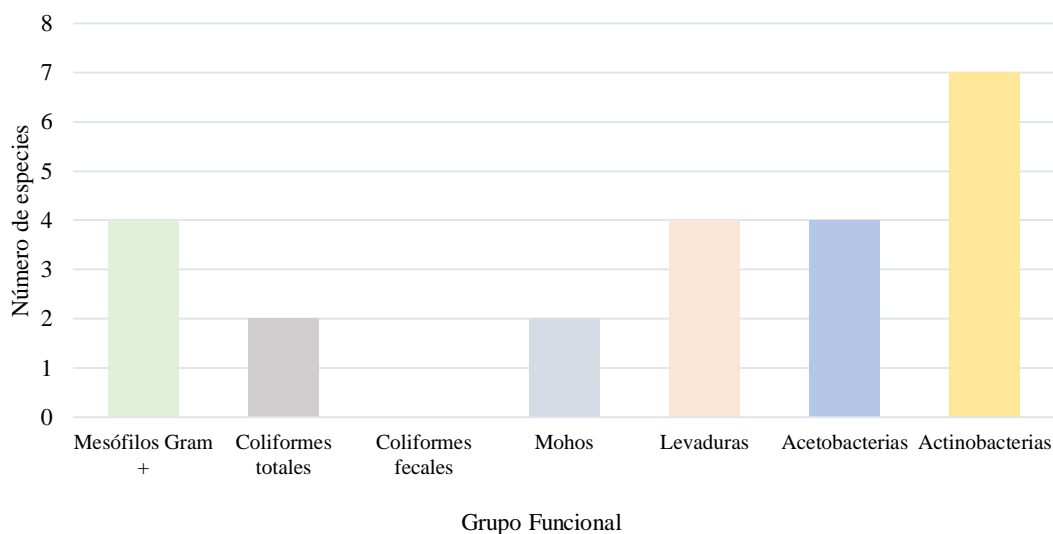


Figura 31. Riqueza en número de especies identificadas por grupo funcional en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®.

En cinco de los seis grupos funcionales identificados en este sustrato, se observó una disminución en la riqueza de especies después del día 8 del proceso de fermentación, resaltando que al día 16 de fermentación los coliformes totales desaparecieron del medio. Es importante destacar que en el análisis no se encontró ningún coliforme fecal presente en el medio, demostrando las buenas prácticas en el beneficio del café y seguramente demostrando que el medio es selectivo con estas bacterias que no prosperan en ambientes tan ácidos. Al igual que en las mieles del Tanque Tina® la desaparición de mohos en el medio después del día 8 del proceso de fermentación debido posiblemente a que estos grupos taxonómicos pueden consumir con mayor rapidez los azúcares totales presentes en el medio.

En cuanto a la riqueza de actinomicetos se observó una disminución de las especies pertenecientes a este grupo funcional a los 8 días del proceso fermentativo, condición que también se observó en la riqueza de bacterias ácido acéticas en las que disminuyó una especie (Figura 32). Este comportamiento se atribuye a que los actinomicetos y las acetobacterias comparten nichos ecológicos similares, condición que puede desencadenar interacciones antagónicas de competencia o entre las especies (Paul & Frey, 2023). La disminución en el número de especies de estos grupos funcionales no incide necesariamente en una menor producción de ácidos orgánicos ya que la competencia o antagonismo entre ciertas especies de microorganismos puede favorecer el

crecimiento poblacional de otras especies precursoras de la síntesis de estos compuestos (Forbes, 2009).

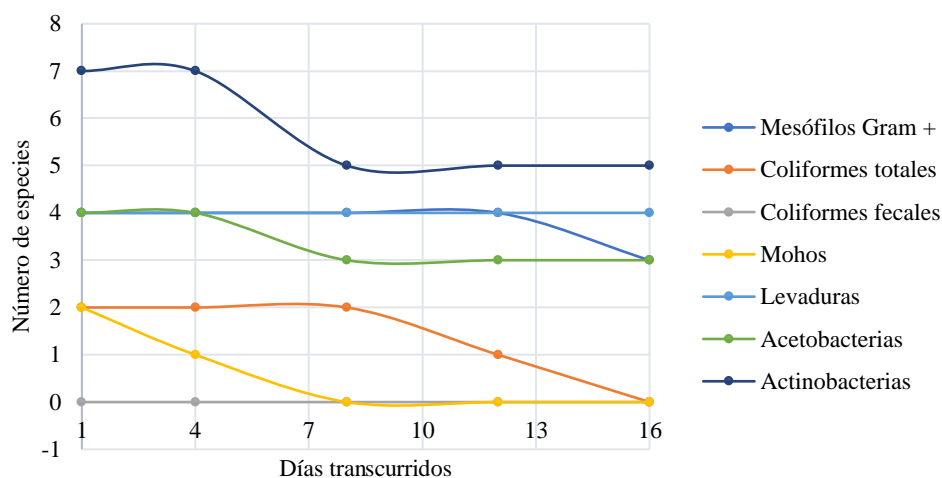


Figura 32. Variaciones en la riqueza de especies pertenecientes a los diferentes grupos funcionales identificados en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® a lo largo de 16 días de fermentación aeróbica.

La abundancia de los grupos funcionales también se vio afectada en función de los cambios fisicoquímicos reportados en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®. Los mesófilos Grampositivos fueron el grupo funcional más representativo en términos de abundancia, mostrando las mayores concentraciones desde el momento inicial la fermentación y durante los 16 días del proceso, con valores promedio cercanos a los  $400 \times 10^3$  UFC/mL. Los actinomicetos también mostraron unas altas abundancias al iniciar la fermentación, con valores promedios cercanos a los  $400 \times 10^3$  UFC/mL (Figura 33).

El grupo funcional de coliformes totales presentó una abundancia promedio de  $300 \times 10^3$  UFC/mL al iniciar el proceso de fermentación de la aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®, valores tres veces mayor a los valores observados en las mieles del Ecomill®, con poblaciones de  $30 \times 10^2$  UFC/mL de *Escherichia coli* y  $88 \times 10^2$  UFC/mL de *Enterobacter sp.*, indicando una posible contaminación cruzada en las aguas utilizadas para el lavado las cuales provienen de nacimiento natural en donde la presencia de aves y mamíferos puede haber incidido en esta respuesta. Sin embargo, es de notar que una vez transcurrió el proceso fermentativo de este sustrato las concentraciones de *E. coli* desaparecieron por efecto de la acidificación del pH,

condición que inhibe el crecimiento de esta especie sin inhibir completamente el crecimiento de otras enterobacterias.

Las acetobacterias mostraron una dinámica de crecimiento constante a medida que avanzó el proceso de fermentación de las aguas de taque Tina®, comportamiento similar al observado en las mieles del Ecomill® y atribuido principalmente a que estos microorganismos están íntimamente involucrados en los procesos de fermentación aeróbica en donde ocurre la síntesis de ácido acético. Por último, al igual que en las mieles del Ecomill®, se observó que la población de mohos fue baja y disminuyó gradualmente hasta desaparecer en el día 12 del proceso de fermentación, indicando así, que estos organismos no son fuertes competidores ante las bacterias y levaduras presentes.

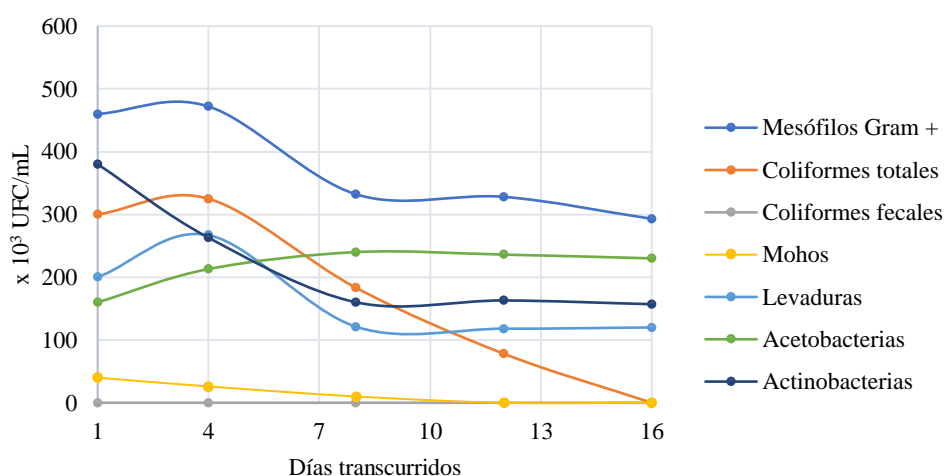


Figura 33. Variaciones en la abundancia de especies pertenecientes a los diferentes grupos funcionales identificados en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina® a lo largo de 16 días de fermentación aeróbica.

Los géneros de microorganismos identificados han sido ampliamente reportados como microorganismos nativos del café, sobresaliendo los géneros *Staphylococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Mucor* sp., *Saccharomyces* sp., *Streptomyces* sp., *Bacillus*, *Candida* sp., *Penicillium* sp., *Lactobacillus* sp., *Acetobacter* sp. y *Enterobacter* sp., detectados en el análisis presentado en la Tabla 3.

Tabla 3. Especies de microorganismos identificadas por grupo funcional en las aguas de primera cabeza de lavado del Tanque Tina®

Grupo funcional	Género
Mesófilos Grampositivos	<i>Staphylococcus</i> sp.
	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Enterobacterias	<i>Enterobacter</i> sp.
	<i>Serratia</i> sp.
Mohos	<i>Penicillium</i> sp.
	Mucoral
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Candida</i> sp.
	<i>Torulaspora</i> sp.
	<i>Candida</i> sp.
Bacterias Acéticas	<i>Acetobacter aceti</i>
	<i>Acetobacter</i> sp.
	<i>Gluconobacter</i> sp.
	Acetobacteria
Actinomicetos	<i>Micrococcus</i> sp.
	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Actinomyces</i> sp.
	<i>Actinomyces</i> sp.
	<i>Actinomyces</i> sp.
<i>Rhodococcus</i> sp.	

La diversidad de microorganismos presentes en las mieles del Ecomill® fue ligeramente mayor a la diversidad determinada en las aguas del Tanque Tina®, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ambas aguas residuales ( $p = 0,344$ ), indicando que, aunque el número de especies fue un poco menor en las aguas del Tanque Tina®, al tener en cuenta las abundancias de las especies presentes, esta diferencia no tuvo un impacto significativo en las comunidades microbianas del medio, infiriendo que el método de lavado del café no afectó de manera significativa a la diversidad de especies microbianas representadas según el índice de Shannon de ambos sustratos de aguas residuales del café (Figura 34). Este comportamiento puede atribuirse a la dominancia de algunos grupos taxonómicos como los actinomicetos, levaduras y mesófilos Grampositivos, los cuales representaron la mayor proporción de la biomasa microbiana encontrada en nuestros análisis, impactando la riqueza de especies de manera significativa pero no la diversidad de las mismas.

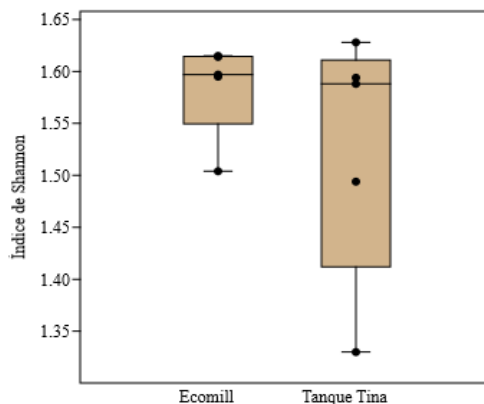


Figura 34. Diferencias en la diversidad de especies entre las mieles del Ecomill® y las aguas del Tanque Tina® en diagrama de cajas.

Se observó que las variaciones en las concentraciones de ácidos orgánicos afectaron el comportamiento general de los grupos funcionales analizados. Tanto en las mieles del Ecomill® como en las aguas del lavado del Tanque Tina®, se apreció una disminución en la cantidad de especies en la mayoría de grupo funcionales a medida que transcurría el proceso de fermentación, esto puede deberse a la naturaleza bacteriostática propia del ácido acético la cual inhibe el crecimiento y la reproducción de algunas especies microbianas que terminan perdiendo viabilidad a causa de esta sustancia (Ray & Sandine, 2019). En ambos sustratos de aguas residuales se encontró una disminución en la riqueza de especies de Enterobacterias, comportamiento que se acentuó principalmente en las aguas de la primera cabeza de lavado del Tanque Tina® a medida que transcurría el tiempo de fermentación. Ryssel et al., (2009), reportaron una alta sensibilidad de las enterobacterias (bacterias Gramnegativas) a los pH ácidos, siendo principalmente sensibles al ácido acético.

Rhee et al., (2003) demostraron un comportamiento similar con los mohos, los cuales disminuyen su riqueza a medida que aumentaba la concentración de ácidos orgánicos en el medio, lo cual puede explicar las disminuciones encontradas en la riqueza de este grupo funcional a medida que la concentración de ácido acético aumentaba. Otros autores reportan que algunos microorganismos como *Aspergillus flavus* presentan relaciones antagónicas con otras especies debido tanto a la competencia por nutrientes, caso en el cual aumenta la secreción de enzimas y otros compuestos que generan un efecto inhibitorio de la síntesis de ácidos orgánicos como el acético y el láctico (Pelaez et al., 2012).

Se observó además que las concentraciones de ácidos orgánicos reportados por su acción bioherbicida de los dos sustratos de aguas residuales evaluados, mostró una respuesta diferencial en cuanto a la riqueza y a la abundancia de los grupos funcionales de microorganismos. En el caso de las mieles del Ecomill®, se encontró una mayor riqueza de microorganismos respecto con las aguas del Tanque Tina®, condición que puede atribuirse a una menor concentración de ácidos orgánicos que afectó la dinámica de crecimiento de algunos grupos de microorganismos. En términos de la abundancia observada en los diferentes grupos funcionales, se evidenció que las mieles del Ecomill® presentaron una mayor abundancia microbiológica en comparación con las aguas provenientes del Tanque Tina®; condición que puede atribuirse a las diferencias en las concentraciones de azúcares reductores las cuales influyen directamente en la proliferación de acetobacterias y levaduras precursoras de la síntesis de ácido acético, explicando así la mayor concentración de este ácido encontrada en este sustrato.

En ambos sustratos se apreció un incremento en la abundancia de acetobacterias, al igual que el aumento de ácido acético, corroborando el efecto precursor de este grupo funcional en la síntesis de este ácido orgánico. Por otro lado, los mesófilos Grampositivos encontrados en ambos sustratos presentaron una alta abundancia respecto a los demás grupos funcionales, siendo estos, importantes precursores de la síntesis del ácido láctico. Los géneros *Lactobacillus* spp. y *Bacillus* spp. fermentan las azúcares por la vía del ácido láctico (Koneman et al., 2008), condición que puede explicar las variaciones en las concentraciones encontradas en ambos sustratos, que aunque fueron mucho menores que las concentraciones de ácido acético, esta condición también refleja que la actividad microbiana de este grupo funcional puede deberse al uso particular de los recursos por parte de los diferentes microorganismos.

En las observaciones microscópicas de los diferentes aislamientos de los microorganismos encontrados en ambos sustratos de aguas residuales el lavado del café sometidos a fermentación prolongada se destacan para grupo funcional de los actinomicetos, los géneros *Actinomyces* sp., *Streptomyces* sp., y *Rhodococcus* sp.; para el grupo funcional de los mesófilos Grampositivos se destacan los géneros *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus* sp., y *Nocardia* sp.; para el grupo de la levaduras, los géneros *Saccharomyces* sp.; *Candida* sp. (Figura 35).

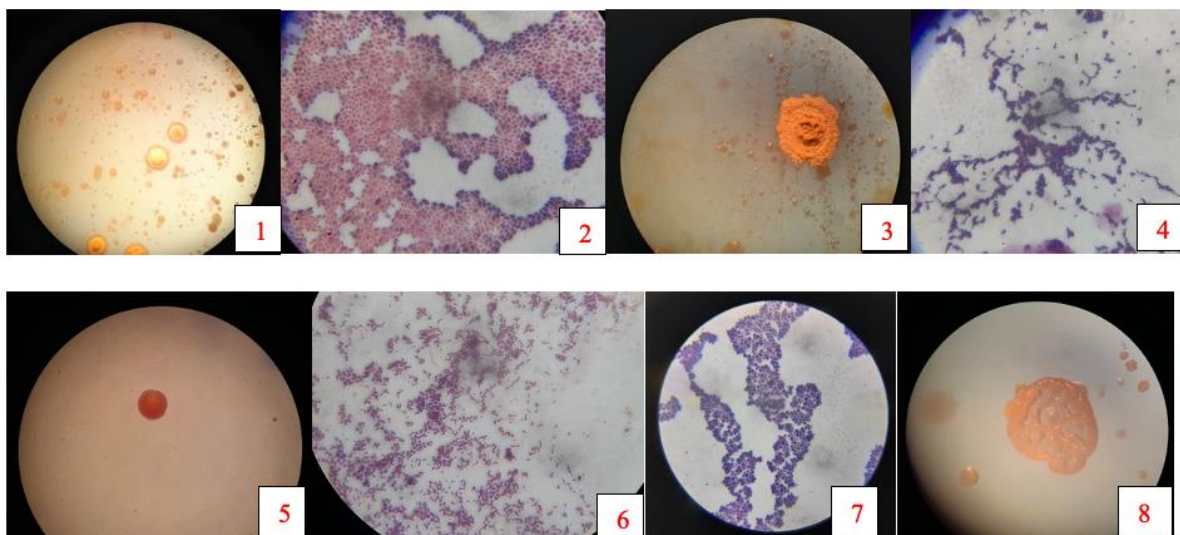


Figura 35. Imágenes de microscopía de algunos microorganismos asociados a la fermentación de aguas residuales del café sometidas a fermentación aeróbica de 16 días (Foto 1. *Actinomyces* sp.; Foto 2. *Saccharomyces* sp.; Foto 3. *Streptomyces* sp.; Foto 4. *Lactobacillus* sp.; Foto 5. *Rhodococcus* sp.; Foto 6. *Staphylococcus* sp.; Foto 7. *Candida* sp.; Foto 8. *Nocardia* sp.).

#### 4.4. Análisis del efecto bioherbicida de la aplicación foliar de filtrados fermentados de los dos sustratos de aguas residuales del lavado, ácidos orgánicos en disolución y el herbicida comercial glufosinato de amonio

Esta etapa comenzó con la caracterización botánica de las especies de arvenses en cada una de las 35 unidades experimentales (UE), en donde se registraron 257 observaciones visuales en las cuales se identificaron 32 especies de arvenses (Tabla 4).

Tabla 4. Características botánicas de las especies de arvenses identificadas mediante observación visual en las unidades experimentales en condiciones de casa de malla (Adaptado de Salazar, 2021).

Especie de arvense	Grupo taxonómico	Tipo de hoja	Familia
<i>Bidens pilosa</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Asteraceae
<i>Blechum pyramidatum</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Acanthaceae
<i>Borreria alata</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Rubiaceae
<i>Commelina spp</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Commelinaceae
<i>Cyathula achyranthoides</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Amaranthaceae
<i>Digitaria sanguinalis</i>	Monocotiledónea	Hoja angosta	Poaceae
<i>Drymaria cordata</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Caryophyllaceae
<i>Eleusine indica</i>	Monocotiledónea	Hoja angosta	Poaceae

<i>Emilia sonchifolia</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Asteraceae
<i>Euphorbia hirta</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Euphorbiaceae
<i>Gallinsoga ciliata</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Asteraceae
<i>Gallinsoga cuadriculata</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Asteraceae
<i>Hydrocotyle umbellata</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Araliaceae
<i>Hypoxis decumbens</i>	Monocotiledonea	Hoja angosta	Hypoxidaceae
<i>Hyptis atrorubens</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Lamiaceae
<i>Hyptis lurida</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Lamiaceae
<i>Ipomoea purpurea,</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Colvovunaceae
<i>Oplismenus burmannii</i>	Monocotiledonea	Hoja angosta	Poaceae
<i>Oxalis curniculata</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Oxalidaceae
<i>Oxalis latifolia</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Oxalidaceae
<i>Oxalis repens</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Oxalidaceae
<i>Panicum laxum</i>	Monocotiledonea	Hoja angosta	Poaceae
<i>Paspalum conjugatum</i>	Monocotiledonea	Hoja angosta	Poaceae
<i>Paspalum paniculatum</i>	Monocotiledonea	Hoja angosta	Poaceae
<i>Phyllanthus niruri</i>	Monocotiledonea	Hoja angosta	Phyllanthaceae
<i>Pseudelephantopus spicatus</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Asteraceae
<i>Sida acuta</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Malvaceae
<i>Solanum nigrum</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Solanaceae
<i>Talinum paniculatum</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Talinaceae
<i>Tripogandra serrulata</i>	Eudicotiledónea	Hoja ancha	Commelinaceae
<i>Zea mays</i>	Monocotiledonea	Hoja angosta	Poaceae

Al analizar la composición de las arvenses registradas durante las observaciones se identificó que el 67,4% de las especies fueron de tipo “hoja ancha” (eudicotiledóneas) y el 32,6% de las especies fueron de tipo “hoja angosta” (monocotiledóneas), así mismo de acuerdo al grupo taxonómico y al tipo de hoja de cada una de las especies identificadas se realizó un análisis de frecuencias para determinar que especies predominaban mayormente a través de las 35 unidades

experimentales, en donde la especie que se presentó con mayor frecuencia fue *Panicum laxum*, identificándose en el 68,57% de las unidades experimentales (Figura 36).

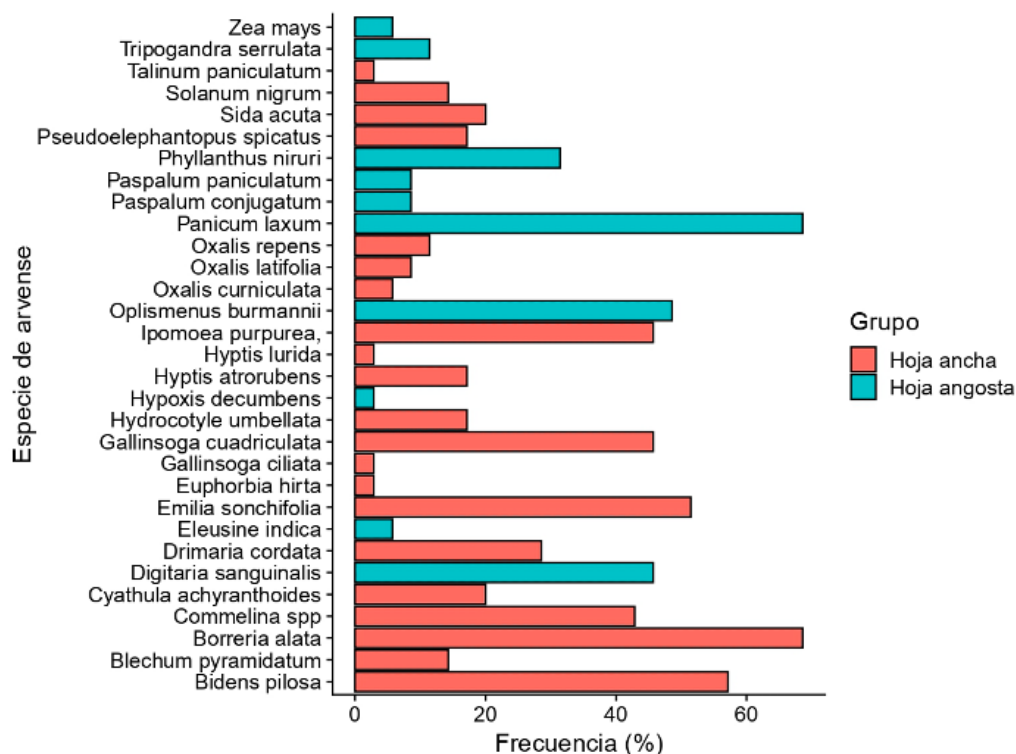


Figura 36. Porcentaje de frecuencia de cada una de las especies de arvenses identificadas en las unidades experimentales en relación con el tipo de hoja (hoja ancha: eudicotiledónea, hoja angosta: monocotiledónea).

En lo que respecta al nivel de interferencia de las especies de arvenses identificadas en las unidades experimentales, se encontró que el 34,31% de las especies presentan un nivel de interferencia “alta” con el cultivo del café, el 9,37% de las especies presentan un nivel de interferencia “media”, el 12,50% de las especies de arvenses presentaron un nivel de interferencia “baja”, mientras que el 40,62% de las especies pertenecían al grupo de las arvenses “nobles”.

Dentro de las especies de nivel de interferencia alta se identificaron 6 especies de gramíneas correspondientes a *Panicum laxum* (presente en el 68,5% de las unidades UE), *Digitaria sanguinalis* (presente en el 45,7% de las unidades UE), *Paspalum conjugatum* (presente en el 8,57% de las unidades UE) y *Paspalum paniculatum* (presente en el 8,57 % de las unidades UE), *Eleusine indica* (presente en el 5,71% de las unidades UE) y *Zea mays* (presente en el 5,71% de las unidades UE). Estas especies son de importancia económica para el café debido su alto grado

de competencia por nutrientes con el cultivo, altos costos de manejo químico con herbicidas gramínicos selectivos como el fluazifop-butil y adicionalmente han sido reportadas por presentar biotipos resistentes a algunos herbicidas sistémicos no selectivos como el glifosato y el glufosinato de amonio (Salazar, Hincapié, Menza y Torres, 2020). Adicionalmente se identificaron 5 especies de hoja ancha de interferencia alta, correspondientes a *Borreria alata* (presente en el 68,57% de las unidades UE), *Sida acuta* (presente en el 20% de las unidades UE), *Pseudelephantopus spicatus* (presente en el 17,14% de las unidades UE), *Ipomea purpurea* (presente en el 45,71% de las unidades UE) y *Talinum paniculatum* (presente en el 2,85% de las unidades UE); estas especies también son de importancia económica dada su competencia con el cultivo de café debido a su difícil control químico y manual, alta producción de semillas y sistemas radiculares profundos (Salazar, 2021).

En términos de las especies de interferencia media se identificaron 3 especies correspondientes a *Emilia sonchifolia* (presente en el 51,42% de las unidades UE), *Cyathula achiranthoides* (presente en el 20% de las unidades UE), y *Solanum nigrum* (presente en el 14,28% de las unidades UE). Estas especies también son de importancia económica para el cultivo del café debido a su alta capacidad de dispersión y que son hospederas del nemátodo *Meloidogyne incognita* y de insectos plaga del café como las cochinillas de la raíz (Salazar, 2021).

Por su parte dentro de las especies de interferencia baja se identificaron 3 especies correspondientes a *Bidens pilosa* (presente en el 57,14% de las unidades UE), *Galinsoga cudriculata* (presente en el 45,71% de las unidades UE) y *Galinsoga ciliata* (presente en el 2,85% de las unidades UE). Las especies de la familia compositae son de gran importancia ecosistémica debido a que atraen con sus flores nectaríferas a insectos polinizadores como abejas, disminuyen la erosión hídrica y contribuyen a la recuperación de suelos degradados por trazas de metales pesados (Salazar, 2021). En cuanto a las arvenses nobles se identificaron 11 especies correspondientes a *Commelina* spp. (presente en el 42,85% de las unidades UE), *Drymaria cordata* (presente en el 28,57% de las unidades UE), *Hyptis atrorubens* (presente en el 17,14% de las unidades UE), *Hydrocotyle umellata* (presente en el 17,14% de las unidades UE), *Blechum pyramidatum* (presente en el 14,28% de las unidades UE), *Tripogandra serrulata* (presente en el 11,42% de las unidades UE), *Oxalis repens* (presente en el 11,42% de las unidades UE), *Oxalis latifolia* (presente en el 8,57% de las unidades UE), *Oxalis corniculata* (presente en el 5,71% de las unidades UE), *Hyptis lurida* (presente en el 2,85% de las unidades UE) y *Euphorbia hirta*

(presente en el 2,85% de las unidades UE). Esta gran abundancia de coberturas nobles son el resultado de la implementación de planes de manejo integrado de arvenses que han combinado por varios años diferentes métodos de control cultural, manual, mecánico y químico con selector de arvenses; condición que permite a estas especies disminuir el efecto de la erosión hídrica causada por la lluvia y reducir la pérdida de suelo por escorrentía superficial (Salazar, 2021).

Una vez concluida la caracterización botánica de las arvenses, se procedió a determinar en cada una de las unidades experimentales los porcentajes iniciales de la cobertura verde fraccional (CVF) mediante la aplicación Canopeo® en el día 0. Esta lectura se realizó previa a la aplicación foliar de los tratamientos con el objetivo de registrar los valores de referencia que sentarían la línea base para comparar el comportamiento individual de cada tratamiento a través del tiempo. Posterior a la aplicación de cada uno de los tratamientos correspondientes a: (1) filtrados fermentados de las mieles del Ecomill®, (2) filtrados fermentados de las aguas de la primera cabeza de lavado del tanque-tina®, (3) ácido acético al 20%, (4) ácido cítrico al 10%, (5) mezcla de ácido acético al 20% + ácido cítrico al 10%, (6) herbicida glufosinato de amonio en dosis de 10 mL/L y (7) testigo absoluto donde no se aplicó ningún producto; se realizaron mediciones del porcentaje de CVF en cada una de las unidades experimentales a los 3, 7, 14 y 21 días después de la aplicación, con el objetivo de registrar las variaciones en la variable de respuesta asociada con el porcentaje de control de las arvenses obtenido con cada tratamiento.

Para cada tratamiento y tiempo de medición (0, 3, 7, 14 y 21 días) de la variable de respuesta porcentaje de cobertura verde fraccional, se determinó el promedio, la desviación estándar y el error estándar. Posteriormente, la evaluación del efecto herbicida de los tratamientos se analizó a partir de un diseño de bloques completos al azar con medidas repetidas. Dado que el análisis de varianza (ANOVA) mostró efecto de la interacción entre el tiempo de medición y los tratamientos, se realizó el análisis de las diferencias de los efectos simples mediante un análisis de comparación múltiple con ajuste de Bonferroni al 5%, con el objetivo de identificar la respuesta a través del tiempo en términos de porcentaje de control y/o persistencia asociada a cada tratamiento (Figura 37). Se especificó además una estructura de covarianza no estructurada (UN) para modelar las correlaciones entre las mediciones repetidas en diferentes momentos, permitiendo una mayor flexibilidad en la evaluación de la relación temporal entre las mediciones. Este tipo de análisis estadístico permitió definir: (i) si la respuesta de los tratamientos dependía de la composición de

los mismos o de los tiempos que transcurrían después de su aplicación, o (ii) si la respuesta se mantenía a través del tiempo lo que indicaría su persistencia diferencial.

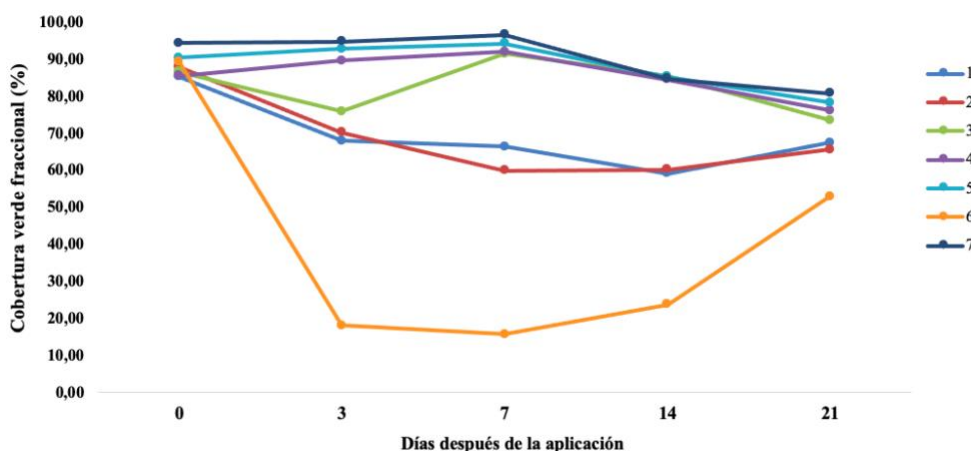


Figura 37. Cambios en los porcentajes de cobertura verde fraccional de las arvenses, asociados a cada uno de los tratamientos a los 3, 7, 14 y 21 días después de la aplicación. Cada una de las líneas corresponden a los tratamientos evaluados de la siguiente manera: tratamiento 1 (filtrados fermentados de las mieles del Ecomill®); tratamiento 2 (filtrados fermentados de las aguas de la primera cabeza de lavado del tanque-tina®); tratamiento 3 (ácido acético al 20%); tratamiento 4 (ácido cítrico al 10%); tratamiento 5 (mezcla de ácido acético al 20% + ácido cítrico al 10%); tratamiento 6 (Glufosinato de amonio – Testigo relativo); tratamiento 7 (testigo absoluto sin aplicación).

Descriptivamente las variaciones en el porcentaje promedio de cobertura verde fraccional de las arvenses presentes en unidades experimentales correspondientes al tratamiento 1 (filtrados fermentados de las mieles del Ecomill®) registraron valores de 85,28 % en el día 0; 68,4% en el día 3; 66,44% en el día 7; 59,13 % en el día 14 y 67,43% en el día 21; indicando que su porcentaje máximo de control fue de 26,15% y se registró a los 14 días después de la aplicación. Las unidades experimentales correspondientes el tratamiento 2 (filtrados fermentados de las aguas de la primera cabeza de lavado del tanque-tina®) registraron valores promedio de CVF de 87,95 % en el día 0; 70,29% en el día 3; 59,94% en el día 7; 60,21 % en el día 14 y 65,68% en el día 21; indicando que su porcentaje máximo de control fue de 28,01% y se registró a los 7 días después de la aplicación. Las unidades experimentales correspondientes el tratamiento 3 (ácido acético al 20%) registraron valores promedio de CVF de 86,57 % en el día 0; 75,98 % en el día 3; 91,51% en el día 7; 85,48 % en el día 14 y 73,55% en el día 21; indicando que su porcentaje máximo de control fue de 13,02% y se registró a los 21 días después de la aplicación. Las unidades experimentales correspondientes el tratamiento 4 (ácido cítrico al 10%) registraron valores promedio de CVF de 85,61 % en el día 0; 89,59 % en el día 3; 92,06% en el día 7; 84,54 % en el día 14 y 76,25% en el

día 21; indicando que su porcentaje máximo de control fue de 15,81% y se registró entre los días 7 y 21 después de la aplicación. Las unidades experimentales correspondientes el tratamiento 5 (mezcla de ácido acético al 20% + ácido cítrico al 10%) registraron valores promedio de CVF de 90,41 % en el día 0; 92,87 % en el día 3; 94,30% en el día 7; 85,30 % en el día 14 y 78,32% en el día 21; indicando que su porcentaje máximo de control fue de 15,98% y se registró entre los días 7 y 21 después de la aplicación. Las unidades experimentales correspondientes el tratamiento 6 (Glufosinato de amonio – Testigo relativo) registraron valores promedio de CVF de 89,27 % en el día 0; 18,05 % en el día 3; 15,81% en el día 7; 23,82 % en el día 14 y 52,90% en el día 21; indicando que su porcentaje máximo de control fue de 76,46% y se registró a los 7 días después de la aplicación. Las unidades experimentales correspondientes el tratamiento 7 (testigo absoluto sin aplicación) registraron valores promedio de CVF de 94,41 % en el día 0; 94,85 % en el día 3; 96,71% en el día 7; 84,82 % en el día 14 y 80,87% en el día 21; variaciones que respondieron más a cambios en la cobertura de las arvenses atribuidos a la sensibilidad de las arvenses a condiciones de invernadero y a la naturaleza decidua de algunas especies de arvenses presentes en las unidades experimentales. En la Tabla 5 se presentan los promedios y los errores estándar de la CVF de las arvenses por cada tratamiento de acuerdo a los días después de la aplicación; en donde para cada tiempo las letras no comunes indican diferencias estadísticas entre tratamientos con un nivel de significancia del 5%; las cuales solo se encontraron al comparar todos los tratamientos en el día 7 después de la aplicación (*a*, *b* y *c*). En los días 3, 7 y 14; el porcentaje de CVF de todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticas frente al herbicida químico glufosinato de amonio (*b*, *c* y *b*).

Tabla 5. Promedio y error estándar para la cobertura verde fraccional de las arvenses por tratamiento de acuerdo a los días después de aplicación.

ID	Tratamiento	Días después de la aplicación									
		0		3		7		14		21	
		Promedio	EE	Promedio	EE	Promedio	EE	Promedio	EE	Promedio	EE
1	Filtrados fermentados de las mieles del Ecomill®	85,28	5,09	68,04 <sup>a</sup>	4,94	66,44 <sup>b</sup>	2,75	59,13 <sup>a</sup>	5,98	67,43 <sup>a</sup>	4,35
2	Filtrados fermentados de las aguas de la primera cabeza de lavado del tanque-tina®	87,95	3,03	70,29 <sup>a</sup>	6,45	59,94 <sup>b</sup>	4,44	60,21 <sup>a</sup>	4,77	65,68 <sup>a</sup>	5,87

3	Ácido acético al 20%	86,57	1,69	75,98 <sup>a</sup>	9,76	91,51 <sup>a</sup>	2,63	85,48 <sup>a</sup>	3,61	73,55 <sup>a</sup>	5,84
4	Ácido cítrico al 10%	85,61	2,24	89,59 <sup>a</sup>	2,64	92,06 <sup>a</sup>	2,13	84,54 <sup>a</sup>	3,79	76,25 <sup>a</sup>	4,87
5	Mezcla de ácido acético al 20% + ácido cítrico al 10%	90,41	1,91	92,87 <sup>a</sup>	0,80	94,30 <sup>a</sup>	1,31	85,30 <sup>a</sup>	4,53	78,32 <sup>a</sup>	3,39
6	Herbicida glufosinato de amonio en dosis de 10 mL/litro	89,27	3,23	18,05 <sup>b</sup>	6,94	15,81 <sup>c</sup>	3,62	23,82 <sup>b</sup>	5,30	52,90 <sup>a</sup>	6,35
7	Testigo absoluto sin aplicación	94,41	1,29	94,85 <sup>a</sup>	0,85	96,71 <sup>a</sup>	1,10	84,82 <sup>a</sup>	5,94	80,87 <sup>a</sup>	5,25

Para cada tiempo, letras no comunes, indican diferencias entre tratamientos, con un nivel de significación del 5%. EE: Error Experimental.

El comportamiento diferencial a través del tiempo evidenciado en la interacción (tiempo x Tratamiento), permitió realizar un análisis comparativo de los efectos simples entre todos los tratamientos a partir de una prueba Bonferroni al 5%; la cual mostró que para el tiempo 0 no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos, indicando un control experimental al inicio que indica que las condiciones fueron homogéneas para todas las unidades experimentales. La prueba de comparación mostró que la respuesta de los tratamientos no fue la misma en todos los tiempos de evaluación, destacándose que para los días 3, 7 y 14, los tratamientos 1 y 2 (filtrados de las aguas residuales del lavado del café) superaron los porcentajes de control obtenidos con los tratamientos 3, 4 y 5 (ácidos orgánicos en disolución) ( $P_{adj} < 0,0001$ ). Adicionalmente la prueba mostró que no hubo diferencias estadísticas significativas para los tratamientos 4 y 5, frente al testigo absoluto en donde no se aplicó ningún producto a partir del día 14, indicando una baja persistencia de los controles obtenidos con ácido cítrico al 10% y con la mezcla de ácido acético al 20% con ácido cítrico al 10%. Para el caso del testigo relativo (glufosinato de amonio) se encontraron diferencias estadísticas entre el día 14 y el día 21 ( $P_{adj} < 0,0001$ ), en los que el porcentaje de control se redujo en casi un 30%; a diferencia de los tratamientos 1 y 2 (filtrados de aguas residuales del lavado del café) que no mostraron diferencias estadísticas entre los días 14 y 21 después de la aplicación, indicando una mayor persistencia de los tratamientos orgánicos frente al herbicida químico (Figura 37). Otro hallazgo importante está relacionado con el hecho de que para el día 21 no se encontraron diferencias estadísticas entre todos los tratamientos incluyendo al testigo relativo, lo que indica que a medida que transcurre el tiempo, las arvenses desarrollan nuevo

tejido lo que se refleja en los aumentos del porcentaje CVF registrados en el día 21 después de la aplicación (Anexo 5).

Dado que hubo efecto de interacción, se analizaron los efectos simples (fijar el nivel de uno de los factores y comparar los niveles del segundo factor en éste) el cual se hizo mediante prueba de comparación múltiple con ajuste de Bonferroni, dado que: (i) La prueba de Bonferroni es un método más general y conservador que puede usarse para cualquier tipo de comparación múltiple, no solo entre pares; (ii) ajusta el nivel de significancia dividiendo el valor de  $\alpha$  entre el número total de comparaciones ( $\alpha/k$ ), lo que reduce la probabilidad de error tipo I para cada comparación individual; (iii) tiende a ser más conservadora, especialmente cuando se tienen muchas comparaciones, y puede reducir la potencia de la prueba (probabilidad de detectar una diferencia cuando realmente existe) en comparación con Tukey, (iv) se utiliza cuando las comparaciones no están limitadas a comparaciones de pares y cuando se quiere controlar fuertemente el error general. En general, la prueba de Bonferroni es más conservadora y se aplica en este contexto para controlar rigurosamente el error tipo I.

Los resultados anteriormente presentados permiten analizar nuevas hipótesis de trabajo en el campo de la investigación sobre el desarrollo de bioinsumos a partir de subproductos del café siguiendo tanto los preceptos de la bioeconomía circular como las tendencias actuales de la investigación en tecnologías de producción sostenible. Estas nuevas hipótesis de trabajo sugieren líneas de investigación dirigidas a aumentar la persistencia de los controles al utilizar bioherbicidas de ácidos orgánicos, buscando aumentar su eficacia por periodos más prolongados en comparación con herbicidas sintéticos como el glufosinato de amonio. Adicionalmente se vislumbran oportunidades de investigación sobre los efectos en la microbiota del suelo derivada del uso recurrente de los bioherbicidas, así como su influencia en el ambiente en donde factores climáticos como la temperatura y la humedad pueden afectar su tasa de descomposición o afectar su efectividad sobre diferentes especies de arvenses. La interacción de los bioherbicidas con otros métodos de control incluidos en los planes de manejo integrado de arvenses también es un campo de investigación que puede ser enriquecido con los hallazgos derivados de la presente investigación ya que aún se desconocen los beneficios económicos y ambientales de la aplicación de dicha tecnología al ser combinada con métodos culturales, mecánicos y químicos.

Desde el punto de vista de las tendencias actuales en la investigación sobre bioinsumos se subraya la importancia de este tipo de desarrollos en el auge de la bioeconomía circular en donde

se busca el aprovechamiento de residuos agroindustriales para la elaboración de bioinsumos reduciendo así la contaminación y los costos operativos relacionados con las fuentes de materia prima para su producción. Adicionalmente, el uso de aplicaciones digitales como Canopeo® facilitan la evaluación de cambios en los porcentaje de cobertura verde fraccional de las arvenses como un método eficaz, preciso y de bajo costo que permite el monitoreo del efecto herbicida de nuevos productos. Finalmente siguiendo la tendencia global de producción limpia que fomenta la reducción de uso de agroquímicos en los sistemas agroalimentarios, este tipo de investigaciones sostenibles promueven alternativas biológicas encaminadas a minimizar los impactos negativos sobre los ecosistemas naturales.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente trabajo brinda aportes metodológicos y analíticos para avanzar en investigaciones posteriores en el campo de los biosistemas integrados, específicamente en el área de la bioeconomía circular en donde la utilización de subproductos como materias primas para la elaboración de bioinsumos, representa una alternativa sostenible para la sustitución progresiva de los insumos de síntesis química. Este tipo de tecnologías promueven además la transformación biológica y el aprovechamiento sostenible de productos contaminantes que pueden reingresar de manera recurrente y cíclica dentro de los sistemas productivos sin convertirse en vertimientos tóxicos que amenacen la salud de los ecosistemas terrestres o acuáticos.

En el contexto actual de la caficultura colombiana, la transición hacia modelos productivos más sostenibles implica un cambio de paradigma respecto a la dependencia de los insumos químicos como garantes de la productividad, condición que requiere enormes esfuerzos científicos, económicos y educativos que conlleven al remplazo secuencial de los ingredientes activos de los agroquímicos utilizados en las fincas dentro de los planes de manejo integrado del cultivo del café; transición que no solo responde a las nuevas exigencias de los mercados internacionales por alimentos de mayor inocuidad, sino que además garantiza la trazabilidad por parte de los consumidores de las prácticas sostenibles que se realizaron durante los procesos de producción desarrollados a través del ciclo de vida del café.

En el caso particular de las investigaciones sobre bioherbicidas para el cultivo del café se remarca el enorme potencial de los subproductos como el mucílago presente en las aguas residuales del lavado como materia prima para la transformación biológica de los azúcares reductores en ácidos orgánicos para el control biológico de las arvenses de la zona cafetera colombiana; sin embargo, es importante subrayar la necesidad de adelantar nuevas investigaciones hasta niveles de madurez tecnológica más avanzados (TRL 6- TRL9 ) que permitan la validación en entornos reales de los prototipados desarrollados en el marco de esta investigación bajo condiciones controladas, lo que facilitaría el avance en procesos de depuración, optimización y validación antes de su demostración y producción a escala en plantas piloto. Otras contribuciones relacionadas con los hallazgos de la presente investigación recaen en la democratización de las tecnologías de producción de bioinsumos, ya que a partir de materias primas de fácil acceso se podría promover

---

en el mediano plazo, la fabricación de bioinsumos de gran utilidad para los procesos productivos, condición que impactaría positivamente las dimensiones sociales, económicas y ambientales de la sostenibilidad cafetera nacional e internacional.

Para facilitar la adopción de bioherbicidas en la caficultura colombiana, es fundamental avanzar en estudios de validación en campo para evaluar su eficacia en diferentes condiciones climáticas y edafológicas, garantizando su viabilidad a gran escala, lo que resalta la necesidad de desarrollar metodologías más robustas que permitan medir la efectividad y persistencia en distintos escenarios que tengan en cuenta las necesidades específicas de los caficultores. Adicionalmente es importante formular nuevas investigaciones para evaluar el impacto ambiental del uso de bioherbicidas mediante estudios de ciclo de vida, midiendo la reducción en huella de carbono y beneficios ecológicos asociados que fortalezcan la argumentación científica para su adopción y permitan a los caficultores conocer los beneficios ambientales de su implementación.

Según los lineamientos del SNIA, las políticas de apoyo e incentivos económicos pueden desempeñar un papel clave en la transición hacia el uso de insumos biológicos ya que la regulación y certificación de estos productos son necesarias para asegurar su reconocimiento en el mercado y su comercialización en sectores especializados. Esta necesidad resalta la necesidad del trabajo conjunto entre el gobierno, centros de investigación y asociaciones de productores para fomentar un marco regulatorio que facilite la adopción masiva de este tipo de tecnologías sostenibles.

En resumen, la integración de los bioherbicidas en la caficultura es una oportunidad para mejorar la sostenibilidad del sector, en donde a través de esfuerzos conjuntos entre la academia, el gremio y el gobierno nacional se avance conjuntamente hacia una producción de café más ecológica, eficiente y rentable.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abouziena, H.F., A.M. Omar, S.D. Sharma, and M. Singh. 2009. Efficacy comparison of some new natural-product herbicides for weed control at two growth stages. *Weed Technol.* 23:431–437.
- Ancy, Chandran, Muthunarayanan, Ravindran, Khanh, Cuong, Bui, Hao, Hoan, Chang y Duc, (2020), “Evaluation of efficacy of indigenous acidophile-bacterial consortia for removal of pollutants from coffee cherry pulping wastewater”, *Bioresource Technology Reports*, Volume 11, 100533, ISSN 2589-014X.
- Ancy, Vasanthi, Selvi, Ravindran, Chung y Chang, (2021), “Treatment of coffee cherry pulping wastewater by using lectin protein isolated from *Ricinus communis* L. seed”, *Journal of Water Process Engineering*, Volume 39, 101742, ISSN 2214-7144.
- Anderson, L. (2007), “Potential for sediment-applied acetic acid for control of invasive *Spartina alterniflora*”, *Journal of Aquatic Plant Management* (45), p. 100-105
- Arias, H. A. (1991). La descomposición de la materia orgánica y su relación con algunos factores climáticos y microclimáticos. *Agronomía colombiana*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/33947>
- Ashenafi, Velmurugan y Kumaran, (2021), “Treatment of wastewater from coffee (*coffea arabica*) industries using mixed culture *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* bacteria”, *Materials Today: Proceedings*, Volume 46, Part 17, Pages 7396-7401.
- Behera, B. C., Mishra, R., & Mohapatra, S. (2021). Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. *Food Frontiers*, 2(1), 62-76. <https://doi.org/10.1002/fft2.66>
- Blandón, G., Rodríguez, N., & Dávila, T. (1998). Caracterización microbiológica y física química de los subproductos del beneficio del café en proceso de compostaje. *Cenicafé* 49(3):169-185. ISSN: 0120-0275
- Blandón, G., Dávila, M. T., & Rodríguez, N. (1999). Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombri-compostaje. *Cenicafé*, 50(1), 5-23. <http://hdl.handle.net/10778/753>
- Bressani, A. P. P., Martínez, S. J., Sarmiento, A. B. I., Borém, F. M., & Schwan, R. F. (2020). Organic acids produced during fermentation and sensory perception in specialty coffee using yeast starter culture. *Food Research International*, 128, 108773. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108773>
- Cai y Gu, (2016), “Bioherbicides in organic agriculture”, *Horticulturae*, Vol. 2, (3), p.10
- Carbonero Zalduegui, P. (1975). *Bioquímica de las fermentaciones*. Universidad Politécnica de Madrid., Madrid. ISBN 8460067548. <https://oa.upm.es/cgi/export/55235/>

- Centanaro L., E.; Gutiérrez F., J.I. (1991). Caracterización de los ácidos orgánicos y de algunos otros sólidos solubles presentes en las aguas de lavado frescas del café. Bogotá (Colombia), Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. 95 p.
- Champagne, C. P., Gardner, N. J., & Lacroix, C. (2007). Fermentation technologies for the production of exopolysaccharide-synthesizing *Lactobacillus rhamnosus* concentrated cultures. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 211-220.
- Chinery, D. (2001), "Evaluation of acetic acid-based herbicides for use in broad-spectrum turfgrass and weed control", Final Project Report to de NYS IPM Program. Agriculture IPM 2000-2001, Cornell University
- CODEX ALIMENARIUS (2024). International Food Standards. Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). Disponible en <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>
- COMPES 4052. Política para la sostenibilidad de la caficultura colombiana.(2019). Dirección Nacional de Planeación (DNP). República de Colombia. Disponible en <https://sioc.minagricultura.gov.co/Noticias/Lists/Posts/Post.aspx?ID=283>
- Córdoba, N., & Guerrero, J. E. (2016). Caracterización de los procesos tradicionales de fermentación de café en el departamento de Nariño. *Biotecnología en el Sector agropecuario y agroindustrial*, 14(2), 75-83.
- Coronell, M. C., & Herrera, V. L. (2022). Caracterización de Bacterias Fermentadoras en el Mucílago de Café Arábica Obtenido en dos Fincas de la Serranía del Perijá, Cesar. Universidad de Santander.
- Dávila, M. D., Gallegos, G., Hernández, F. D., Ochoa, Y. M., & Flores, A. (2013). Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(8), 1187-1196.
- DECRETO 50 DE 2018. (2018). "Por el cual se modifica parcialmente el Decreto 1076 de 2015, Decreto único Reglamentario del Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible en relación con los Consejos Ambientales Regionales de la Macrocuencas (CARMAC), el Ordenamiento del Recurso Hídrico y Vertimientos y se dictan otras disposiciones" <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=85084>
- DECRETO 2667 DE 2012 (Diciembre 21). (2012). Presidencia de la República. Por el cual se reglamenta la tasa retributiva por la utilización directa e indirecta del agua como receptor de los vertimientos puntuales, y se toman otras determinaciones. [https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma\\_pdf.php?i=51042](https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma_pdf.php?i=51042)

- Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2020). *Economía Circular: Primer Reporte 2020*. DANE. <https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/economia-circular/economia-circular-1-reporte.pdf>
- Domenghini, J. C. (2020). Comparison of Acetic Acid to Glyphosate for Weed Suppression in the Garden. *HortTechnology hortte*, 30(1), 82-87. Retrieved Apr 1, 2024, from <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04453-19>
- Duke, S.O., Dayan, F.E., Rimando, A.M. Shrader, K., Aliotta, G., Oliva, A. & Romagni, J.G. (2002). Chemicals from nature for weed management. *Weed Science*, 50: 138-151.
- Duque O, H., Salazar, H. M., Rojas-Sepúlveda, L. A., & Gaitán, Á. (2021). Análisis económico de tecnologías para la producción de café en Colombia. *Cenicafé*. <https://doi.org/10.38141/cenbook-0016>
- Elmore, C. L., Roncoroni, J., Spencer, D. F., Elmore, C. L., Ksander, G. G., & Roncoroni, J. A. (2003). Influence of Dilute Acetic Acid Treatments on American Pondweed Winter Buds in the Nevada Irrigation District, California. *Journal of Aquatic Plant Management*, Vol. 41, pp. 65-68.
- Ferreira, Campos, Alves, Freitas y Ferreira, (2021), “Protocol to select efficient microorganisms to treat coffee wastewater”, *Journal of Environmental Management*, Volume 278, Part 2, 111541, ISSN 0301-4797.
- Fischer, H., & Kuzyakov, Y. (2010). Sorption, microbial uptake and decomposition of acetate in soil: Transformations revealed by position-specific <sup>14</sup>C labeling. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(2), 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.015>
- Forbes, B. A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana. ISBN, 9500682435, 9789500682435
- Garde, Buchberger, Wendell y Kupferle, (2017), “Application of Moringa Oleifera seed extract to treat coffee fermentation wastewater”, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 329, Pages 102-109, ISSN 0304-3894.
- Gómez A, Rivera P. (1995), “Descripción de arvenses en plantaciones de café, Cenicafé; 1995 Disponible en: <https://books.google.com/cu/books?id=LF3pMgEACAAJ>
- Guillamón, J. M., & Mas, A. (2011). Acetic Acid Bacteria. *Molecular Wine Microbiology* (pp. 227-255). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10009-8>
- Hasan, M., Ahmad-Hamdani, M. S., Rosli, A. M., & Hamdan, H. (2021). Bioherbicides: An eco-friendly tool for sustainable weed management. *Plants*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/plants10061212>
- Hincapié-Gómez, E., Salazar-Guitierrez, L.F. (2007), “Manejo de arvenses en la zona central cafetera”, *Cenicafé*, Avance técnico N° 359, mayo, 2007, p. 12

- Holden, N. M., Wolfe, M. L., Ogejo, J. A., & Cummins, E. J. (2020). Introduction to Biosystems Engineering. American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE) in association with Virginia Tech Publishing, Virginia Tech Libraries. <https://doi.org/10.21061/IntroBiosystemsEngineering>
- Horan, A. C. (1994). Aerobic actinomycetes: a continuing source of novel natural products. *Discovery of Novel Natural Products with Therapeutic Potential*, 3-30.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura- IICA. (2020). Políticas públicas para los bioinsumos hacia un espacio de intercambio en América Latina y El Caribe. <https://blog.iica.int/blog/politicas-publicas-para-los-bioinsumos-hacia-un-espacio-intercambio-en-america-latina-caribe>. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/20515>
- Isaza H., J. D. (1996). Manual de laboratorio de biodigestión anaeróbica y caracterización de aguas residuales. Chinchiná (Colombia), CENICAFÉ. p.v.
- Jackels, S.C., Jackels, C. F. (2005), Characterization of the coffee mucilage fermentation process using chemical indicators: A field study in Nicaragua. *Journal of food science* 70(5):C321-C325.
- Jog, R., Nareshkumar, G., & Rajkumar, S. (2016). Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. *Plant growth promoting actinobacteria: a new avenue for enhancing the productivity and soil fertility of grain legumes*, 33-45.
- Jones, D. L., Dennis, P. G., Owen, A. G., & Van Hees, P. A. W. (2003). Organic acid behavior in soils-misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil*, Vol. 248, pp. 31-41.
- Koneman, E., Winn Jr, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckenberber, P., & Woods, G. (2008). Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. In *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido* (pp. xxxv-1565). ISBN: 978-950-06-0895-4
- Kostina-Bednarz, M., Płonka, J., & Barchanska, H. (2023). Allelopathy as a source of bioherbicides: Challenges and prospects for sustainable agriculture. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 22(2), 471-504. <https://doi.org/10.1007/s11157-023-09656-1>
- Kremer, R.J. (2002), “Bioherbicides: potential successful strategies for weed control” , USDA-Cropping Systems and Water Quality Unit, University of Missouri, 2002, pp. 307-323
- Kremer, R.J. (2005), “The role of herbicides in weed management”, *Biopesticides International* Vol.1, núm. 3-4, diciembre, 2005, pp. 127-141
- Kremer, R.J. (2019), “Bioherbicides and nanotechnology: current status and future trends”, *Nanopesticides Today and Future Perspectives*, 2019, pp. 353-366

- Lati, R. N., Filin, S., & Eizenberg, H. (2011). Robust Methods for Measurement of Leaf-Cover Area and Biomass from Image Data. *Weed Science*, 59(2), 276-284. <https://doi.org/10.1614/WS-D-10-00054.1>
- LEY 1333 DE 2009 (Julio 21). (2009). Congreso de la República. Por la cual se establece el procedimiento sancionatorio ambiental y se dictan otras disposiciones. [https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma\\_pdf.php?i=36879](https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma_pdf.php?i=36879)
- López, J.A., Villalba, D.A., Salazar, L.F., Cárdenas, O.A. (2012), “Manejo integrado de arvenses en el cultivo del café”, *Cenicafé*, Avance técnico N° 417, marzo, 2012, p. 8
- Mahachai, P., & Subsoontorn, P. (2021). Assessment of Effectiveness of Vinegar and Hydrogen Peroxide Based Herbicide Formulation Against Common Weeds in Thailand (Naresuan University Journal: Science and Technology, Vol. 29, pp. 3-3).
- Martinez, S.J., Pereira, A.P., Ribeiro, D., Pavesi, J.B., Freitas, R. (2019), “Effects of bacterial and yeast starters on formation of volatile and organic acid compounds in coffee beans and selection flavors markers precursors during wet fermentation”, *Frontiers in microbiology*, Vol. 10 Artículo 1287, junio 2019, pp. 1-13
- McNeill, J., Grant, R., & Van Der Meulen, A. (2005). Integrated biosystems for resource conservation in rural industries: An Australian experience. *Ethics in Science and Environmental Politics*, 9, 23–31. <https://doi.org/10.3354/esep005023>
- Menza, H. D., & Salazar, L. F (2006). Estudios de resistencia al glifosato en tres arvenses de la zona cafetera colombiana, y alternativas para su manejo. *Avances Técnicos de Cenicafé*, 350, 1-12. <http://hdl.handle.net/10778/344>
- Mettler, S., & Weibel, E. (2018). Osmolality, pH, and titratable acidity of sports drinks on the Swiss market. *Swiss Sports & Exercise Medicine*, 66(4), 56-63.
- Montero, S., Cardozo, J., Diniz, C., Cañarte, E. (2016), “Vinegar as desiccant of cover crops and its effect on soil microbial activity in the non-tillage system”, *Revista La Técnica*. N° 16, julio-diciembre, 2016, pp. 16-25
- Ministerio de Ciencias, Tecnología e Innovación – MinCiencias(2016). TRL - Niveles de Madurez Tecnológica. Documento de Política Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación N°1602: Actores del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación
- Misión de Sabios Colombia (2019).Gobierno de Colombia. Misión internacional de sabios para el avance de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación. Pacto por la Ciencia, la Tecnología y la Innovación: Un sistema para construir el conocimiento del futuro. ISBN Impreso: 978-958-5135-12-3

- Montilla, J., Arcila, J., Aristizábal, M., Montoya, E. C., Puerta, G. I., Oliveros, C. E., & Cadena, G. (2008). Caracterización de algunas propiedades físicas y factores de conversión del café durante el proceso de beneficio húmedo tradicional. *Cenicafé*.
- Moran, P. J., & Greenberg, S. M. (2008). Winter cover crops and vinegar for early-season weed control in sustainable cotton. *Journal of Sustainable Agriculture*, 32(3), 483-506. <https://doi.org/10.1080/10440040802257835>
- Murray, P. R., Rosenthal, K., & Pfaller, M. A. (2017). *Microbiología médica*. Elsevier Health Sciences. ISBN: 8491130888
- Mwendwa JM, Weston PA, Weidenhamer JD (2021). Metabolic profiling of benzoxazinoids in the roots and rhizosphere of commercial winter wheat genotypes. *Plant Soil* 466:467–489. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04996-9>
- Oliveros, C. E., Sanz, J. R., Ramírez, C. A., & Tibaduiza, C. A. (2014). ECOMILL: Tecnología de bajo impacto ambiental para el lavado del café. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- Organización Internacional del Café- OIC. (2018). Consejo Internacional del Café -Período de sesiones 122. Londres, Reino Unido. Disponible en <https://icocoffee.org/documents/cy2017-18/icc-122-10-r1c-maximum-residue-limits.pdf>
- Owen, M. D. (2002). Acetic acid (vinegar) for weed control revisited. *Integrated Crop Management News Agriculture and Natural Resources* <http://lib.dr.iastate.edu/cropnewshttp://lib.dr.iastate.edu/cropnews/1837>
- Palma, M.I., González F.R. (1989). Algunos cambios químicos que sufren las aguas residuales del beneficio del café por almacenamiento. Bogotá (Colombia), Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. 134 p.
- Patrick, I., McNeill, J., Stuart, D., Wilkes, J., Glencross-Grant, R., Meulan, A. V. D., Thaisa Erwin, Clibborn, B., Curtis, M., & Cathcart, M. (2004). Designing a 'Best Practice' Model of Integrated Biosystems of Waste Re-Use in a Typical Rural Town. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33860.01924>
- Patrignani, A., & Ochsner, T. E. (2015). Canopeo: A Powerful New Tool for Measuring Fractional Green Canopy Cover. *Agronomy Journal*, 107(6), 2312-2320. <https://doi.org/10.2134/agronj15.0150>
- Paul, E., & Frey, S. (Eds.). (2023). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Elsevier Hardback ISBN: 9780128229415, eBook ISBN: 9780128234150
- Payán, C. I. (2011). Aislamiento, identificación y conservación de microorganismos presentes en residuos lignocelulósicos (Pulpa) provenientes del beneficio del Café. Universidad Católica de Manizales. <https://repositorio.ucm.edu.co/handle/10839/300>

- Peláez, A. L., Cataño, C. S., Yepes, E. Q., Villarroel, R. G., De Antoni, G. L., & Giannuzzi, L. (2012). Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control*, 24(1-2), 177-183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.024>
- Peñuela, A. E., Sanz, J. R., & Pabón, J. P. (2014). Método para identificar el momento final de la fermentación de mucílago de café. *Cenicafé* 63(1):120-131. 2012. ISSN: 0120-0275. <http://hdl.handle.net/10778/517>
- Peñuela-Martínez, A. E., Guerrero, A., & Sanz-Uribe, J. R. (2022). Cromacafé® Herramienta para identificar los estados de madurez de las variedades de café de fruto rojo. *Avances Técnicos Cenicafé*, 535, 1–8. <https://doi.org/10.38141/10779/0535>
- Política Nacional para la gestión integral del recurso hídrico.(2010). Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. <https://www.minambiente.gov.co/wp-content/uploads/2021/10/Politica-nacional-Gestion-integral-de-recurso-Hidrico-web.pdf>
- Puerta-Quintero, G., & Ríos-Arias, S. (2011). Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración (*Cenicafé*, Vol. 62, Número 2, pp. 23-40).
- Puerta, G.I., Marín, M.J., Osorio, G.A. (2012), “Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección”, *Cenicafé*, N° 63(2), 2012, pp. 58-78
- Pujiswanto, H., Yudono, P., Sulistyaningsih, E., & Sunarminto, B. H. (2013). “Effect of acetic acid as pre-plant herbicide on maize germination”. *ARNP Journal of Agricultural and Biological Science* efect. *Journal of Agricultural Science environmental*, 8(10), e252525.
- Radhakrishnan, R., Alqarawi, A. A., & Abd\_Allah, E. F. (2018). Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.018>
- Rahayuningsih, S., Supriadi, S. (2005), “Herbicidal efficacy of acetic acid and citric acid base on broad leaf weed of medicinal crop fields”, *Bulletin Penelitian Tanaman Rempah*, Vol. 25 N° 2, 2014
- Rasmussen, J., Nørremark, M., & Bibby, B. (2007). Assessment of leaf cover and crop soil cover in weed harrowing research using digital images. *Weed Research*, 47(4), 299-310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2007.00565.x>
- Ray, B., & Sandine, W. E. (2019). Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. In *Food biopreservatives of microbial origin* (pp. 103-136). CRC press. ISBN: 9781351072069
- Rhee, M. S., Lee, S. Y., Dougherty, R. H., & Kang, D. H. (2003). Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and environmental microbiology*, 69(5), 2959-2963.

DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2959-2963.2003>

Reigosa, M. J., Pedrol, N., & González, L. (Eds.). (2006). Allelopathy. Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/1-4020-4280-9>

Resolución Número 2115 (2007). Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial y ministerio de protección social. Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. 22 de Junio de 2007. <https://minvivienda.gov.co/normativa/resolucion-2115-2007>

Resolución 1207 de 2014 (Julio 25). Derogada por el art. 8, Resolución 1256 de 2021. Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Por la cual se adoptan disposiciones relacionadas con el uso de aguas residuales tratadas. <https://www.minambiente.gov.co/documento-entidad/resolucion-1207-de-2014/>

Resolución 631 de 2015. (2015). Ministro de ambiente y desarrollo sostenible. Por la cual se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público y se dictan otras disposiciones. <https://www.minambiente.gov.co/wp-content/uploads/2021/11/resolucion-631-de-2015.pdf>

Ritchie, D. (1986). SHANNON AND WEAVER: Unravelling the Paradox of Information. *Communication Research*, 13(2), 278-298. <https://doi.org/10.1177/009365086013002007>

Rivera, J.H (1997), “Arvenses y su interferencia en el cultivo del café”, *Avances Técnicos de Cenicafé* N° 237

Rivera, J.H (2004), “Manejo integrado de arvenses en café con criterios de sostenibilidad”, en XI congreso venezolano de malezas, Universidad Nacional Experimental del Táchira, noviembre, 2004, p. 23

Robledo, P. N., Muñoz, K. M., Poggi, H. M., Ríos, E., Calva, G., Ortega, L. A., & Salazar, J. A. (2013). The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *Journal of environmental management*, 128, 126-137.

Rodríguez V., N. (1999). Avances del Experimento QIN-02-03. Metanogénesis de las aguas residuales del beneficio del café. In: Informe anual de actividades 1998-1999. Chinchiná (Colombia), CENICAFÉ. Disciplina de Química Industrial. 90 p.

Rodríguez-Valencia, N. (2009). Estudio de un biosistema integrado para el postratamiento de las aguas residuales del café utilizando macrófitas acuáticas. Universidad Politécnica de Valencia. DOI/10.4995/Thesis/10251/4342

- Rodríguez, N., Zambrano, D.A. (2010), “Los subproductos del café: fuente de energía renovable”, *Cenicafé, Avance técnico* N° 393, marzo, 2010, p. 8. ISSN: 0120-0178. <http://hdl.handle.net/10778/351>
- Rodríguez, N., Zambrano, D.A. (2011), “Producción de alcohol a partir del mucílago del café”, *Cenicafé*, N°62(1), 2011, pp. 56-69. <http://hdl.handle.net/10778/541>
- Rodríguez, Sanz, Oliveros y Ramírez, (2015), “Beneficio del café en Colombia”, *Federación Nacional de Cafeteros, Cenicafé*, 2015, p. 36.
- Rodríguez, N., Quintero, L., & Castañeda, S. A. (2022). Tecnología de filtros verdes para el manejo, tratamiento y cero descargas de las aguas residuales de la finca cafetera. *Libros y Manuales de Cenicafé*. <https://doi.org/10.38141/cenbook-0029>
- Rodríguez-Valencia, N. (2023). Aplicación de la bioeconomía circular en el proceso de beneficio de café con cero residuos: *Cenicafé*. <https://doi.org/10.38141/cenbook-0032>
- Ryssel, H., Kloeters, O., Germann, G., Schäfer, T., Wiedemann, G., & Oehlbauer, M. (2009). The antimicrobial effect of acetic acid—an alternative to common local antiseptics?. *Burns*, 35(5), 695-700. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2008.11.009>.
- Sachs, J. D., Cordes, K. Y., Rising, J., Toledano, P., Maennling, N., & Sachs, J. (2019). Ensuring Economic Viability and Sustainability of Coffee Production. *Columbia Center on Sustainable Investment*. [https://scholarship.law.columbia.edu/sustainable\\_investment\\_staffpubs/53](https://scholarship.law.columbia.edu/sustainable_investment_staffpubs/53)
- Salazar, L.F., Hincapié, E. (2005), “Arvenses de mayor interferencia en los cafetales”, *Avances Técnicos de Cenicafé* N° 333, p. 12. ISSN: 0120-0178. <http://hdl.handle.net/10778/406>
- Salazar, L.F., Hincapié, E. (2007), “Las Arvenses y su manejo en los cafetales”, en *Sistemas de producción de café en Colombia*, Capítulo 5. *Federación Nacional de Cafeteros – Cenicafé* (2007), pp. 102-130
- Salazar, L.F., Hincapié, E. (2009), “Interferencia de arvenses en diferentes etapas del cultivo del café en la zona cafetera central”, *Cenicafé*, N°69(2), 2009, pp. 126-134. ISSN: 0120-0275. <http://hdl.handle.net/10778/227>
- Salazar, L.F., Hincapié, E., Menza, H.D., Torres, F.A. (2020), “Manejo de arvenses en los sistemas de producción de café”, en *Manejo agronómico de los sistemas de producción de café. Cenicafé 80 años*, 2020, pp. 150-196. [https://doi.org/10.38141/10791/0002\\_5](https://doi.org/10.38141/10791/0002_5)
- Salazar-Gutiérrez, L. (2021). Arvenses frecuentes en el cultivo del café en Colombia. *Cenicafé*. <https://doi.org/10.38141/cenbook-0015>
- Salazar-Gutiérrez, L., Cañón, M., Franco, D. A., & Trejos Pinzón, J. F. (2024). Evaluación de equipos y métodos de aplicación de herbicidas en el cultivo del café. *Revista Cenicafé*, 75(1), e75106. <https://doi.org/10.38141/10778/75106>

- Schonbeck, M. (2011), "Principles of sustainable weed management in organic cropping systems", Sustainable Weed Management, Clemson University, 2011, p. 20
- S.G.M., Brigatti, J.G.F., Santos, V.H.M., Mecina, G.F., Silva, L.P. (2013), "Allelopathic effect of the peel of coffee fruit", en *Science horticulturae* N° 158 (2013), pp. 39-44
- SINIA (2021). Proyecto de ley n° 356 de 2021. Cámara 232 de 2021 Senado por medio del cual se constituye el sistema nacional de Insumos agropecuarios, se establece la Política Nacional de Insumos Agropecuarios. [https://www.camara.gov.co/sites/default/files/2021-12/P.L.356-2021C;232-2021S%20\(INSUMOS%20AGROPEURIOS\).pdf](https://www.camara.gov.co/sites/default/files/2021-12/P.L.356-2021C;232-2021S%20(INSUMOS%20AGROPEURIOS).pdf)
- Snell, S. (2012), "Efficacy of organic weed control methods", en USDA - Natural Resources Conservation Service (Final Study Report), pp. 1-8
- Show, P. L., Oladele, K. O., Siew, Q. Y., Aziz Zakry, F. A., Lan, J. C. W., & Ling, T. C. (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in life science*, 8(3), 271-283. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653>
- Torres, J. A. (2023). Actividad antifúngica de actinomicetos marinos y quitosano para el control de *Fusarium solani* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Centro de Investigaciones Biológicas del Norte.
- C Vossen, H.A.M. (2005), "A critical analysis of the agronomic and economic sustainability of organic coffee production", *Expl. Agric*, Vol 41, 2005, Cambridge University Press, pp.449-473
- Webber, C.L., Shrefler, J.W., Brandenberger, L.P. (2012), "Organic Weed Control", *Herbicides-Environmental Impact Studies and Management Approaches*. USDA, 2012, pp. 185-198
- Webber III, C. L., White Jr, P. M., Shrefler, J. W., & Spaunhorst, D. J. (2018). Impact of Acetic Acid Concentration, Application Volume, and Adjuvants on Weed Control Efficacy. *Journal of Agricultural Science*, 10(8), 1-1. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n8p1>
- Werrie, P. Y., Durenne, B., Delaplace, P., & Fauconnier, M. L. (2020). Phytotoxicity of essential oils: Opportunities and constraints for the development of biopesticides. A review. *Foods*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/foods9091291>
- Yúfera, E. P. (1996). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Tomo 1. Universidad Politécnica de Valencia Editorial Reverté. Barcelona (España) [https://books.google.com.co/books/about/Qu%C3%ADmica\\_org%C3%A1nica\\_b%C3%A1sica\\_y\\_aplicada\\_de.html?id=4eX-mdTjyHcC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.co/books/about/Qu%C3%ADmica_org%C3%A1nica_b%C3%A1sica_y_aplicada_de.html?id=4eX-mdTjyHcC&redir_esc=y)
- Zambrano F., D. A.; Isaza H., J. D. (1994). Lavado del café en los tanques de fermentación. *Cenicafé* 45(3):106-118. [https://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras\\_publicaciones/revista\\_cenicafe/revista\\_cenicafe\\_arc045\\_03\\_106-118](https://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/revista_cenicafe/revista_cenicafe_arc045_03_106-118)

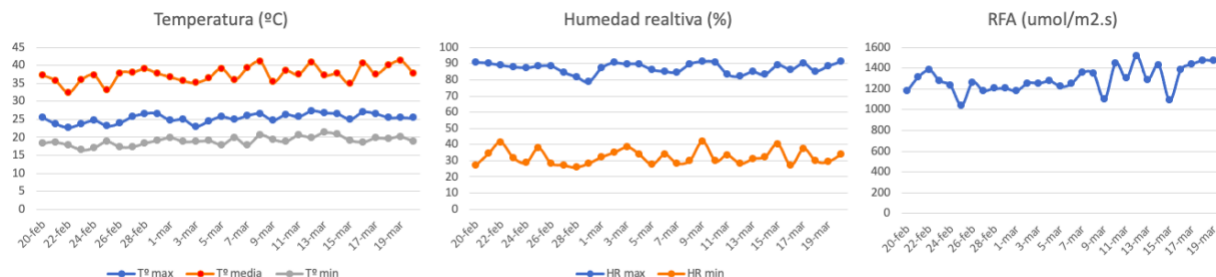
Zambrano F., D. A.; Isaza H., J. D. (1998). Demanda Química de Oxígeno y Nitrógeno total, de los subproductos del proceso tradicional de beneficio húmedo del café. *Cenicafé* 49(4):279-289.

Zambrano F., D. A.; Isaza H., J. D.; Rodríguez V., N.; López P., U. (1999). Tratamiento de aguas residuales del lavado del café. Chinchiná, CENICAFÉ. 26 p. (Boletín Técnico N° 20).

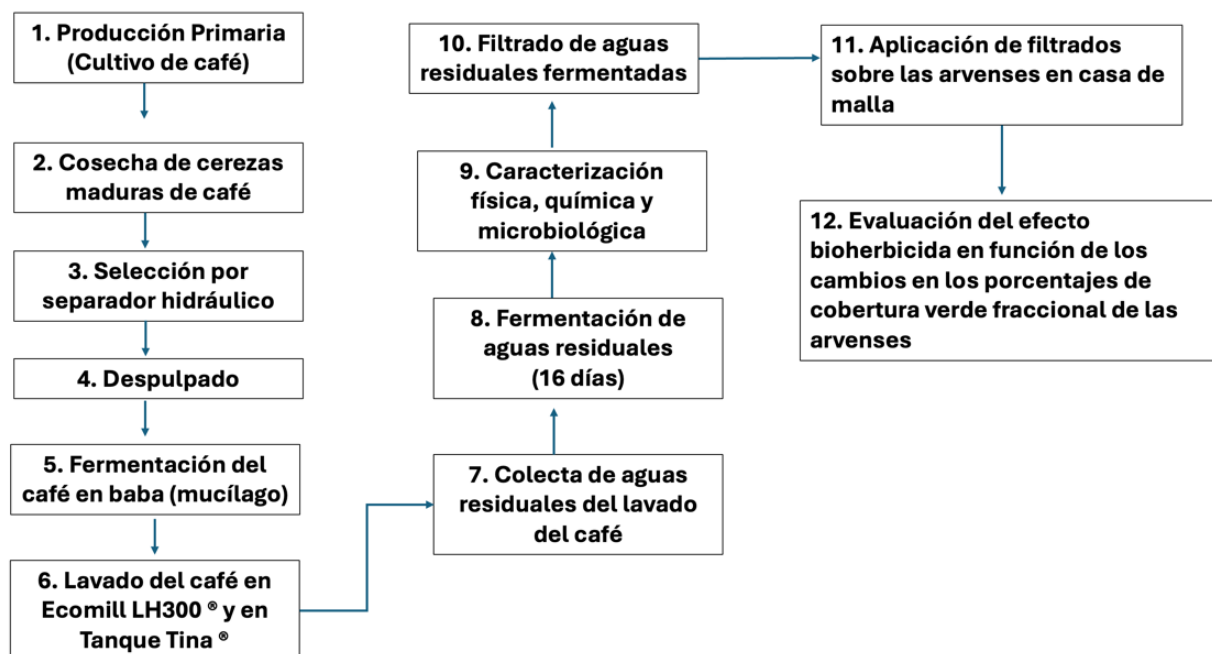
Zuluaga V., J.; Franco J., M.A.; Zambrano F., D.A. (1991). Tratamiento integral del problema de contaminación en el beneficio del café. In: Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetera, 2. Manizales (Colombia), Noviembre 4-7. Resúmenes.

## ANEXOS

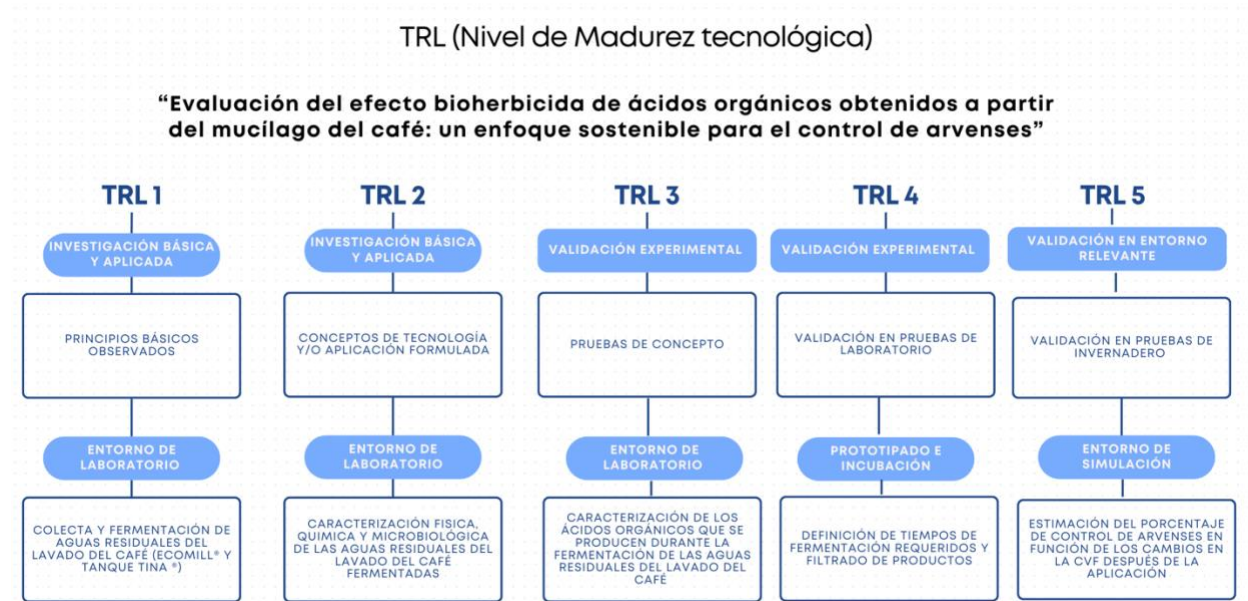
**Anexo 1.** Temperatura (máxima, media y mínima en ° Celsius); Humedad relativa (máxima y mínima en %) y Radiación fotosintéticamente activa (umol/m<sup>2</sup>/segundo), registradas en la casa de malla durante la evaluación.



**Anexo 2.** Diagrama de procesos para la evaluación del efecto bioherbicida de los ácidos orgánicos que se producen durante procesos fermentativos de dos fuentes de aguas residuales del lavado del café.



**Anexo 3.** Diagrama de Nivel de Madurez Tecnológica (TRL) del proceso de evaluación del efecto bioherbicida de los ácidos orgánicos provenientes de las aguas residuales del lavado del café; adaptado del “Documento de Política Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación N° 1602: Actores del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. COLCIENCIAS, 2016”.



**Anexo 4.** Salida de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) utilizado para el análisis estadístico de los datos de CVF de las arvenses en las unidades experimentales.

Model Information	
Data Set	WORK.UNO
Dependent Variable	CVF
Covariance Structures	Variance Components, Unstructured
Subject Effect	BLOQUE(TRATAMIENTO)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
BLOQUE	5	1 2 3 4 5
TRATAMIENTO	7	1 2 3 4 5 6 7
TIEMPO	5	0 3 7 14 21

Dimensions	
Covariance Parameters	16
Columns in X	53
Columns in Z	35
Subjects	1
Max Obs per Subject	175

Number of Observations	
Number of Observations Read	175
Number of Observations Used	175
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates		
Cov Parm	Subject	Estimate
BLOQUE(TRATAMIENTO)		22.1069
UN(1,1)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	27.5993
UN(2,1)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	6.4827
UN(2,2)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	129.85
UN(3,1)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	8.0510
UN(3,2)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	-31.0227
UN(3,3)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	20.3221
UN(4,1)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	33.0235
UN(4,2)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	-17.9350
UN(4,3)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	33.9154
UN(4,4)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	106.61
UN(5,1)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	36.4079
UN(5,2)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	11.3255
UN(5,3)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	20.0286

Covariance Parameter Estimates		
Cov Parm	Subject	Estimate
UN(5,4)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	74.0768
UN(5,5)	BLOQUE(TRATAMIENTO)	125.79

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	988.3
AIC (Smaller is Better)	1020.3
AICC (Smaller is Better)	1024.9
BIC (Smaller is Better)	1045.2

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
BLOQUE	4	24	0.57	0.6866
TRATAMIENTO	6	24	29.85	<.0001
TIEMPO	4	112	137.68	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	24	112	52.69	<.0001

Least Squares Means							
Effect	TRATAMIENT O	TIEMPO	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TRATAMIENTO*TIEMPO	1	0	85.2760	3.1530	112	27.05	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	1	3	68.0380	5.5128	112	12.34	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	1	7	66.4420	2.9130	112	22.81	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	1	14	59.1300	5.0737	112	11.65	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	1	21	67.4340	5.4387	112	12.40	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	2	0	87.9540	3.1530	112	27.90	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	2	3	70.2940	5.5128	112	12.75	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	2	7	59.9400	2.9130	112	20.58	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	2	14	60.2140	5.0737	112	11.87	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	2	21	65.6800	5.4387	112	12.08	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	3	0	86.5720	3.1530	112	27.46	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	3	3	75.9800	5.5128	112	13.78	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	3	7	91.5140	2.9130	112	31.42	<.0001

Least Squares Means							
Effect	TRATAMIENTO	TIEMPO	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TRATAMIENTO*TIEMPO	3	14	85.4800	5.0737	112	16.85	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	3	21	73.5520	5.4387	112	13.52	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	4	0	85.6140	3.1530	112	27.15	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	4	3	89.5860	5.5128	112	16.25	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	4	7	92.0560	2.9130	112	31.60	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	4	14	84.5400	5.0737	112	16.66	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	4	21	76.2500	5.4387	112	14.02	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	5	0	90.4080	3.1530	112	28.67	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	5	3	92.8660	5.5128	112	16.85	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	5	7	94.3020	2.9130	112	32.37	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	5	14	85.2960	5.0737	112	16.81	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	5	21	78.3160	5.4387	112	14.40	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	6	0	89.2740	3.1530	112	28.31	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	6	3	18.0540	5.5128	112	3.27	0.0014
TRATAMIENTO*TIEMPO	6	7	15.8080	2.9130	112	5.43	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	6	14	23.8240	5.0737	112	4.70	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	6	21	52.9000	5.4387	112	9.73	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	7	0	94.4080	3.1530	112	29.94	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	7	3	94.8500	5.5128	112	17.21	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	7	7	96.7120	2.9130	112	33.20	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	7	14	84.8220	5.0737	112	16.72	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	7	21	80.8700	5.4387	112	14.87	<.0001

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	1	0	1	3	17.238	5.3755	3.21	0.3206
Trat * Tiempo	1	0	1	7	18.834	2.5227	7.47	<,0001
Trat * Tiempo	1	0	1	14	26.146	3.6921	7.08	<,0001
Trat * Tiempo	1	0	1	21	17.842	4.0144	4.44	0.0089
Trat * Tiempo	1	0	7	0	-9.132	4.459	-2.05	0.981
Trat * Tiempo	1	0	7	3	-9.574	6.3507	-1.51	0.9999
Trat * Tiempo	1	0	7	7	-11.436	4.2927	-2.66	0.7248
Trat * Tiempo	1	0	7	14	0.454	5.9736	0.08	1
Trat * Tiempo	1	0	7	21	4.406	6.2866	0.7	1
Trat * Tiempo	1	0	5	0	-5.132	4.459	-1.15	1
Trat * Tiempo	1	0	5	3	-7.59	6.3507	-1.2	1
Trat * Tiempo	1	0	5	7	-9.026	4.2927	-2.1	0.9732
Trat * Tiempo	1	0	5	14	-0.02	5.9736	0	1
Trat * Tiempo	1	0	5	21	6.96	6.2866	1.11	1
Trat * Tiempo	1	0	6	0	-3.998	4.459	-0.9	1
Trat * Tiempo	1	0	6	3	67.222	6.3507	10.58	<,0001
Trat * Tiempo	1	0	6	7	69.468	4.2927	16.18	<,0001
Trat * Tiempo	1	0	6	14	61.452	5.9736	10.29	<,0001
Trat * Tiempo	1	0	6	21	32.376	6.2866	5.15	0.0006
Trat * Tiempo	1	0	4	0	-0.338	4.459	-0.08	1
Trat * Tiempo	1	0	4	3	-4.31	6.3507	-0.68	1
Trat * Tiempo	1	0	4	7	-6.78	4.2927	-1.58	0.9997
Trat * Tiempo	1	0	4	14	0.736	5.9736	0.12	1
Trat * Tiempo	1	0	4	21	9.026	6.2866	1.44	1
Trat * Tiempo	1	0	3	0	-1.296	4.459	-0.29	1
Trat * Tiempo	1	0	3	3	9.296	6.3507	1.46	0.9999
Trat * Tiempo	1	0	3	7	-6.238	4.2927	-1.45	1
Trat * Tiempo	1	0	3	14	-0.204	5.9736	-0.03	1
Trat * Tiempo	1	0	3	21	11.724	6.2866	1.86	0.9952
Trat * Tiempo	1	0	2	0	-2.678	4.459	-0.6	1
Trat * Tiempo	1	0	2	3	14.982	6.3507	2.36	0.9008
Trat * Tiempo	1	0	2	7	25.336	4.2927	5.9	<,0001
Trat * Tiempo	1	0	2	14	25.062	5.9736	4.2	0.0212
Trat * Tiempo	1	0	2	21	19.596	6.2866	3.12	0.3811
Trat * Tiempo	1	3	1	7	1.596	6.5148	0.24	1
Trat * Tiempo	1	3	1	14	8.908	7.38	1.21	1
Trat * Tiempo	1	3	1	21	0.604	6.8262	0.09	1
Trat * Tiempo	1	3	7	0	-26.37	6.3507	-4.15	0.0245
Trat * Tiempo	1	3	7	3	-26.812	7.7962	-3.44	0.1922
Trat * Tiempo	1	3	7	7	-28.674	6.2351	-4.6	0.005

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	1	3	7	14	-16.784	7.4922	-2.24	0.9425
Trat * Tiempo	1	3	7	21	-12.832	7.7441	-1.66	0.9994
Trat * Tiempo	1	3	5	0	-22.37	6.3507	-3.52	0.1566
Trat * Tiempo	1	3	5	3	-24.828	7.7962	-3.18	0.3351
Trat * Tiempo	1	3	5	7	-26.264	6.2351	-4.21	0.02
Trat * Tiempo	1	3	5	14	-17.258	7.4922	-2.3	0.9222
Trat * Tiempo	1	3	5	21	-10.278	7.7441	-1.33	1
Trat * Tiempo	1	3	6	0	-21.236	6.3507	-3.34	0.2396
Trat * Tiempo	1	3	6	3	49.984	7.7962	6.41	<,0001
Trat * Tiempo	1	3	6	7	52.23	6.2351	8.38	<,0001
Trat * Tiempo	1	3	6	14	44.214	7.4922	5.9	<,0001
Trat * Tiempo	1	3	6	21	15.138	7.7441	1.95	0.9902
Trat * Tiempo	1	3	4	0	-17.576	6.3507	-2.77	0.6479
Trat * Tiempo	1	3	4	3	-21.548	7.7962	-2.76	0.6507
Trat * Tiempo	1	3	4	7	-24.018	6.2351	-3.85	0.0631
Trat * Tiempo	1	3	4	14	-16.502	7.4922	-2.2	0.9527
Trat * Tiempo	1	3	4	21	-8.212	7.7441	-1.06	1
Trat * Tiempo	1	3	3	0	-18.534	6.3507	-2.92	0.5302
Trat * Tiempo	1	3	3	3	-7.942	7.7962	-1.02	1
Trat * Tiempo	1	3	3	7	-23.476	6.2351	-3.77	0.0814
Trat * Tiempo	1	3	3	14	-17.442	7.4922	-2.33	0.9132
Trat * Tiempo	1	3	3	21	-5.514	7.7441	-0.71	1
Trat * Tiempo	1	3	2	0	-19.916	6.3507	-3.14	0.3679
Trat * Tiempo	1	3	2	3	-2.256	7.7962	-0.29	1
Trat * Tiempo	1	3	2	7	8.098	6.2351	1.3	1
Trat * Tiempo	1	3	2	14	7.824	7.4922	1.04	1
Trat * Tiempo	1	3	2	21	2.358	7.7441	0.3	1
Trat * Tiempo	1	7	1	14	7.312	3.438	2.13	0.969
Trat * Tiempo	1	7	1	21	-0.992	4.6056	-0.22	1
Trat * Tiempo	1	7	7	0	-27.966	4.2927	-6.51	<,0001
Trat * Tiempo	1	7	7	3	-28.408	6.2351	-4.56	0.0059
Trat * Tiempo	1	7	7	7	-30.27	4.1197	-7.35	<,0001
Trat * Tiempo	1	7	7	14	-18.38	5.8505	-3.14	0.3641
Trat * Tiempo	1	7	7	21	-14.428	6.1697	-2.34	0.9091
Trat * Tiempo	1	7	5	0	-23.966	4.2927	-5.58	<,0001
Trat * Tiempo	1	7	5	3	-26.424	6.2351	-4.24	0.0184
Trat * Tiempo	1	7	5	7	-27.86	4.1197	-6.76	<,0001
Trat * Tiempo	1	7	5	14	-18.854	5.8505	-3.22	0.3105
Trat * Tiempo	1	7	5	21	-11.874	6.1697	-1.92	0.9922
Trat * Tiempo	1	7	6	0	-22.832	4.2927	-5.32	0.0003

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	1	7	6	3	48.388	6.2351	7.76	<,0001
Trat * Tiempo	1	7	6	7	50.634	4.1197	12.29	<,0001
Trat * Tiempo	1	7	6	14	42.618	5.8505	7.28	<,0001
Trat * Tiempo	1	7	6	21	13.542	6.1697	2.19	0.9546
Trat * Tiempo	1	7	4	0	-19.172	4.2927	-4.47	0.0082
Trat * Tiempo	1	7	4	3	-23.144	6.2351	-3.71	0.0946
Trat * Tiempo	1	7	4	7	-25.614	4.1197	-6.22	<,0001
Trat * Tiempo	1	7	4	14	-18.098	5.8505	-3.09	0.398
Trat * Tiempo	1	7	4	21	-9.808	6.1697	-1.59	0.9997
Trat * Tiempo	1	7	3	0	-20.13	4.2927	-4.69	0.0036
Trat * Tiempo	1	7	3	3	-9.538	6.2351	-1.53	0.9999
Trat * Tiempo	1	7	3	7	-25.072	4.1197	-6.09	<,0001
Trat * Tiempo	1	7	3	14	-19.038	5.8505	-3.25	0.291
Trat * Tiempo	1	7	3	21	-7.11	6.1697	-1.15	1
Trat * Tiempo	1	7	2	0	-21.512	4.2927	-5.01	0.001
Trat * Tiempo	1	7	2	3	-3.852	6.2351	-0.62	1
Trat * Tiempo	1	7	2	7	6.502	4.1197	1.58	0.9998
Trat * Tiempo	1	7	2	14	6.228	5.8505	1.06	1
Trat * Tiempo	1	7	2	21	0.762	6.1697	0.12	1
Trat * Tiempo	1	14	1	21	-8.304	4.1048	-2.02	0.984
Trat * Tiempo	1	14	7	0	-35.278	5.9736	-5.91	<,0001
Trat * Tiempo	1	14	7	3	-35.72	7.4922	-4.77	0.0027
Trat * Tiempo	1	14	7	7	-37.582	5.8505	-6.42	<,0001
Trat * Tiempo	1	14	7	14	-25.692	7.1754	-3.58	0.1349
Trat * Tiempo	1	14	7	21	-21.74	7.4379	-2.92	0.5268
Trat * Tiempo	1	14	5	0	-31.278	5.9736	-5.24	0.0004
Trat * Tiempo	1	14	5	3	-33.736	7.4922	-4.5	0.0072
Trat * Tiempo	1	14	5	7	-35.172	5.8505	-6.01	<,0001
Trat * Tiempo	1	14	5	14	-26.166	7.1754	-3.65	0.1132
Trat * Tiempo	1	14	5	21	-19.186	7.4379	-2.58	0.7825
Trat * Tiempo	1	14	6	0	-30.144	5.9736	-5.05	0.0009
Trat * Tiempo	1	14	6	3	41.076	7.4922	5.48	0.0001
Trat * Tiempo	1	14	6	7	43.322	5.8505	7.4	<,0001
Trat * Tiempo	1	14	6	14	35.306	7.1754	4.92	0.0015
Trat * Tiempo	1	14	6	21	6.23	7.4379	0.84	1
Trat * Tiempo	1	14	4	0	-26.484	5.9736	-4.43	0.0093
Trat * Tiempo	1	14	4	3	-30.456	7.4922	-4.07	0.0326
Trat * Tiempo	1	14	4	7	-32.926	5.8505	-5.63	<,0001
Trat * Tiempo	1	14	4	14	-25.41	7.1754	-3.54	0.1493
Trat * Tiempo	1	14	4	21	-17.12	7.4379	-2.3	0.9229

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	1	14	3	0	-27.442	5.9736	-4.59	0.0051
Trat * Tiempo	1	14	3	3	-16.85	7.4922	-2.25	0.94
Trat * Tiempo	1	14	3	7	-32.384	5.8505	-5.54	0.0001
Trat * Tiempo	1	14	3	14	-26.35	7.1754	-3.67	0.1056
Trat * Tiempo	1	14	3	21	-14.422	7.4379	-1.94	0.9913
Trat * Tiempo	1	14	2	0	-28.824	5.9736	-4.83	0.0021
Trat * Tiempo	1	14	2	3	-11.164	7.4922	-1.49	0.9999
Trat * Tiempo	1	14	2	7	-0.81	5.8505	-0.14	1
Trat * Tiempo	1	14	2	14	-1.084	7.1754	-0.15	1
Trat * Tiempo	1	14	2	21	-6.55	7.4379	-0.88	1
Trat * Tiempo	1	21	7	0	-26.974	6.2866	-4.29	0.0153
Trat * Tiempo	1	21	7	3	-27.416	7.7441	-3.54	0.1497
Trat * Tiempo	1	21	7	7	-29.278	6.1697	-4.75	0.0029
Trat * Tiempo	1	21	7	14	-17.388	7.4379	-2.34	0.9094
Trat * Tiempo	1	21	7	21	-13.436	7.6915	-1.75	0.9984
Trat * Tiempo	1	21	5	0	-22.974	6.2866	-3.65	0.1108
Trat * Tiempo	1	21	5	3	-25.432	7.7441	-3.28	0.2732
Trat * Tiempo	1	21	5	7	-26.868	6.1697	-4.35	0.0123
Trat * Tiempo	1	21	5	14	-17.862	7.4379	-2.4	0.8821
Trat * Tiempo	1	21	5	21	-10.882	7.6915	-1.41	1
Trat * Tiempo	1	21	6	0	-21.84	6.2866	-3.47	0.1766
Trat * Tiempo	1	21	6	3	49.38	7.7441	6.38	<,0001
Trat * Tiempo	1	21	6	7	51.626	6.1697	8.37	<,0001
Trat * Tiempo	1	21	6	14	43.61	7.4379	5.86	<,0001
Trat * Tiempo	1	21	6	21	14.534	7.6915	1.89	0.9941
Trat * Tiempo	1	21	4	0	-18.18	6.2866	-2.89	0.551
Trat * Tiempo	1	21	4	3	-22.152	7.7441	-2.86	0.5756
Trat * Tiempo	1	21	4	7	-24.622	6.1697	-3.99	0.0413
Trat * Tiempo	1	21	4	14	-17.106	7.4379	-2.3	0.9235
Trat * Tiempo	1	21	4	21	-8.816	7.6915	-1.15	1
Trat * Tiempo	1	21	3	0	-19.138	6.2866	-3.04	0.4339
Trat * Tiempo	1	21	3	3	-8.546	7.7441	-1.1	1
Trat * Tiempo	1	21	3	7	-24.08	6.1697	-3.9	0.0542
Trat * Tiempo	1	21	3	14	-18.046	7.4379	-2.43	0.8703
Trat * Tiempo	1	21	3	21	-6.118	7.6915	-0.8	1
Trat * Tiempo	1	21	2	0	-20.52	6.2866	-3.26	0.285
Trat * Tiempo	1	21	2	3	-2.86	7.7441	-0.37	1
Trat * Tiempo	1	21	2	7	7.494	6.1697	1.21	1
Trat * Tiempo	1	21	2	14	7.22	7.4379	0.97	1
Trat * Tiempo	1	21	2	21	1.754	7.6915	0.23	1

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	7	0	7	3	-0.442	5.3755	-0.08	1
Trat * Tiempo	7	0	7	7	-2.304	2.5227	-0.91	1
Trat * Tiempo	7	0	7	14	9.586	3.6921	2.6	0.7715
Trat * Tiempo	7	0	7	21	13.538	4.0144	3.37	0.2246
Trat * Tiempo	7	0	5	0	4	4.459	0.9	1
Trat * Tiempo	7	0	5	3	1.542	6.3507	0.24	1
Trat * Tiempo	7	0	5	7	0.106	4.2927	0.02	1
Trat * Tiempo	7	0	5	14	9.112	5.9736	1.53	0.9999
Trat * Tiempo	7	0	5	21	16.092	6.2866	2.56	0.7951
Trat * Tiempo	7	0	6	0	5.134	4.459	1.15	1
Trat * Tiempo	7	0	6	3	76.354	6.3507	12.02	<,0001
Trat * Tiempo	7	0	6	7	78.6	4.2927	18.31	<,0001
Trat * Tiempo	7	0	6	14	70.584	5.9736	11.82	<,0001
Trat * Tiempo	7	0	6	21	41.508	6.2866	6.6	<,0001
Trat * Tiempo	7	0	4	0	8.794	4.459	1.97	0.9888
Trat * Tiempo	7	0	4	3	4.822	6.3507	0.76	1
Trat * Tiempo	7	0	4	7	2.352	4.2927	0.55	1
Trat * Tiempo	7	0	4	14	9.868	5.9736	1.65	0.9994
Trat * Tiempo	7	0	4	21	18.158	6.2866	2.89	0.5537
Trat * Tiempo	7	0	3	0	7.836	4.459	1.76	0.9982
Trat * Tiempo	7	0	3	3	18.428	6.3507	2.9	0.5433
Trat * Tiempo	7	0	3	7	2.894	4.2927	0.67	1
Trat * Tiempo	7	0	3	14	8.928	5.9736	1.49	0.9999
Trat * Tiempo	7	0	3	21	20.856	6.2866	3.32	0.254
Trat * Tiempo	7	0	2	0	6.454	4.459	1.45	1
Trat * Tiempo	7	0	2	3	24.114	6.3507	3.8	0.0742
Trat * Tiempo	7	0	2	7	34.468	4.2927	8.03	<,0001
Trat * Tiempo	7	0	2	14	34.194	5.9736	5.72	<,0001
Trat * Tiempo	7	0	2	21	28.728	6.2866	4.57	0.0056
Trat * Tiempo	7	3	7	7	-1.862	6.5148	-0.29	1
Trat * Tiempo	7	3	7	14	10.028	7.38	1.36	1
Trat * Tiempo	7	3	7	21	13.98	6.8262	2.05	0.981
Trat * Tiempo	7	3	5	0	4.442	6.3507	0.7	1
Trat * Tiempo	7	3	5	3	1.984	7.7962	0.25	1
Trat * Tiempo	7	3	5	7	0.548	6.2351	0.09	1
Trat * Tiempo	7	3	5	14	9.554	7.4922	1.28	1
Trat * Tiempo	7	3	5	21	16.534	7.7441	2.14	0.9675
Trat * Tiempo	7	3	6	0	5.576	6.3507	0.88	1
Trat * Tiempo	7	3	6	3	76.796	7.7962	9.85	<,0001
Trat * Tiempo	7	3	6	7	79.042	6.2351	12.68	<,0001

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	7	3	6	14	71.026	7.4922	9.48	<.0001
Trat * Tiempo	7	3	6	21	41.95	7.7441	5.42	0.0002
Trat * Tiempo	7	3	4	0	9.236	6.3507	1.45	1
Trat * Tiempo	7	3	4	3	5.264	7.7962	0.68	1
Trat * Tiempo	7	3	4	7	2.794	6.2351	0.45	1
Trat * Tiempo	7	3	4	14	10.31	7.4922	1.38	1
Trat * Tiempo	7	3	4	21	18.6	7.7441	2.4	0.882
Trat * Tiempo	7	3	3	0	8.278	6.3507	1.3	1
Trat * Tiempo	7	3	3	3	18.87	7.7962	2.42	0.8731
Trat * Tiempo	7	3	3	7	3.336	6.2351	0.54	1
Trat * Tiempo	7	3	3	14	9.37	7.4922	1.25	1
Trat * Tiempo	7	3	3	21	21.298	7.7441	2.75	0.6611
Trat * Tiempo	7	3	2	0	6.896	6.3507	1.09	1
Trat * Tiempo	7	3	2	3	24.556	7.7962	3.15	0.3585
Trat * Tiempo	7	3	2	7	34.91	6.2351	5.6	<.0001
Trat * Tiempo	7	3	2	14	34.636	7.4922	4.62	0.0046
Trat * Tiempo	7	3	2	21	29.17	7.7441	3.77	0.081
Trat * Tiempo	7	7	7	14	11.89	3.438	3.46	0.1834
Trat * Tiempo	7	7	7	21	15.842	4.6056	3.44	0.1919
Trat * Tiempo	7	7	5	0	6.304	4.2927	1.47	0.9999
Trat * Tiempo	7	7	5	3	3.846	6.2351	0.62	1
Trat * Tiempo	7	7	5	7	2.41	4.1197	0.59	1
Trat * Tiempo	7	7	5	14	11.416	5.8505	1.95	0.9904
Trat * Tiempo	7	7	5	21	18.396	6.1697	2.98	0.4812
Trat * Tiempo	7	7	6	0	7.438	4.2927	1.73	0.9986
Trat * Tiempo	7	7	6	3	78.658	6.2351	12.62	<.0001
Trat * Tiempo	7	7	6	7	80.904	4.1197	19.64	<.0001
Trat * Tiempo	7	7	6	14	72.888	5.8505	12.46	<.0001
Trat * Tiempo	7	7	6	21	43.812	6.1697	7.1	<.0001
Trat * Tiempo	7	7	4	0	11.098	4.2927	2.59	0.7787
Trat * Tiempo	7	7	4	3	7.126	6.2351	1.14	1
Trat * Tiempo	7	7	4	7	4.656	4.1197	1.13	1
Trat * Tiempo	7	7	4	14	12.172	5.8505	2.08	0.9766
Trat * Tiempo	7	7	4	21	20.462	6.1697	3.32	0.2546
Trat * Tiempo	7	7	3	0	10.14	4.2927	2.36	0.8995
Trat * Tiempo	7	7	3	3	20.732	6.2351	3.33	0.2499
Trat * Tiempo	7	7	3	7	5.198	4.1197	1.26	1
Trat * Tiempo	7	7	3	14	11.232	5.8505	1.92	0.9925
Trat * Tiempo	7	7	3	21	23.16	6.1697	3.75	0.0841
Trat * Tiempo	7	7	2	0	8.758	4.2927	2.04	0.982

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	7	7	2	3	26.418	6.2351	4.24	0.0184
Trat * Tiempo	7	7	2	7	36.772	4.1197	8.93	<,0001
Trat * Tiempo	7	7	2	14	36.498	5.8505	6.24	<,0001
Trat * Tiempo	7	7	2	21	31.032	6.1697	5.03	0.0009
Trat * Tiempo	7	14	7	21	3.952	4.1048	0.96	1
Trat * Tiempo	7	14	5	0	-5.586	5.9736	-0.94	1
Trat * Tiempo	7	14	5	3	-8.044	7.4922	-1.07	1
Trat * Tiempo	7	14	5	7	-9.48	5.8505	-1.62	0.9996
Trat * Tiempo	7	14	5	14	-0.474	7.1754	-0.07	1
Trat * Tiempo	7	14	5	21	6.506	7.4379	0.87	1
Trat * Tiempo	7	14	6	0	-4.452	5.9736	-0.75	1
Trat * Tiempo	7	14	6	3	66.768	7.4922	8.91	<,0001
Trat * Tiempo	7	14	6	7	69.014	5.8505	11.8	<,0001
Trat * Tiempo	7	14	6	14	60.998	7.1754	8.5	<,0001
Trat * Tiempo	7	14	6	21	31.922	7.4379	4.29	0.0153
Trat * Tiempo	7	14	4	0	-0.792	5.9736	-0.13	1
Trat * Tiempo	7	14	4	3	-4.764	7.4922	-0.64	1
Trat * Tiempo	7	14	4	7	-7.234	5.8505	-1.24	1
Trat * Tiempo	7	14	4	14	0.282	7.1754	0.04	1
Trat * Tiempo	7	14	4	21	8.572	7.4379	1.15	1
Trat * Tiempo	7	14	3	0	-1.75	5.9736	-0.29	1
Trat * Tiempo	7	14	3	3	8.842	7.4922	1.18	1
Trat * Tiempo	7	14	3	7	-6.692	5.8505	-1.14	1
Trat * Tiempo	7	14	3	14	-0.658	7.1754	-0.09	1
Trat * Tiempo	7	14	3	21	11.27	7.4379	1.52	0.9999
Trat * Tiempo	7	14	2	0	-3.132	5.9736	-0.52	1
Trat * Tiempo	7	14	2	3	14.528	7.4922	1.94	0.9913
Trat * Tiempo	7	14	2	7	24.882	5.8505	4.25	0.0175
Trat * Tiempo	7	14	2	14	24.608	7.1754	3.43	0.1966
Trat * Tiempo	7	14	2	21	19.142	7.4379	2.57	0.7863
Trat * Tiempo	7	21	5	0	-9.538	6.2866	-1.52	0.9999
Trat * Tiempo	7	21	5	3	-11.996	7.7441	-1.55	0.9998
Trat * Tiempo	7	21	5	7	-13.432	6.1697	-2.18	0.9587
Trat * Tiempo	7	21	5	14	-4.426	7.4379	-0.6	1
Trat * Tiempo	7	21	5	21	2.554	7.6915	0.33	1
Trat * Tiempo	7	21	6	0	-8.404	6.2866	-1.34	1
Trat * Tiempo	7	21	6	3	62.816	7.7441	8.11	<,0001
Trat * Tiempo	7	21	6	7	65.062	6.1697	10.55	<,0001
Trat * Tiempo	7	21	6	14	57.046	7.4379	7.67	<,0001
Trat * Tiempo	7	21	6	21	27.97	7.6915	3.64	0.1163

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	7	21	4	0	-4.744	6.2866	-0.75	1
Trat * Tiempo	7	21	4	3	-8.716	7.7441	-1.13	1
Trat * Tiempo	7	21	4	7	-11.186	6.1697	-1.81	0.9969
Trat * Tiempo	7	21	4	14	-3.67	7.4379	-0.49	1
Trat * Tiempo	7	21	4	21	4.62	7.6915	0.6	1
Trat * Tiempo	7	21	3	0	-5.702	6.2866	-0.91	1
Trat * Tiempo	7	21	3	3	4.89	7.7441	0.63	1
Trat * Tiempo	7	21	3	7	-10.644	6.1697	-1.73	0.9987
Trat * Tiempo	7	21	3	14	-4.61	7.4379	-0.62	1
Trat * Tiempo	7	21	3	21	7.318	7.6915	0.95	1
Trat * Tiempo	7	21	2	0	-7.084	6.2866	-1.13	1
Trat * Tiempo	7	21	2	3	10.576	7.7441	1.37	1
Trat * Tiempo	7	21	2	7	20.93	6.1697	3.39	0.2145
Trat * Tiempo	7	21	2	14	20.656	7.4379	2.78	0.6405
Trat * Tiempo	7	21	2	21	15.19	7.6915	1.97	0.9886
Trat * Tiempo	5	0	5	3	-2.458	5.3755	-0.46	1
Trat * Tiempo	5	0	5	7	-3.894	2.5227	-1.54	0.9998
Trat * Tiempo	5	0	5	14	5.112	3.6921	1.38	1
Trat * Tiempo	5	0	5	21	12.092	4.0144	3.01	0.4579
Trat * Tiempo	5	0	6	0	1.134	4.459	0.25	1
Trat * Tiempo	5	0	6	3	72.354	6.3507	11.39	<,0001
Trat * Tiempo	5	0	6	7	74.6	4.2927	17.38	<,0001
Trat * Tiempo	5	0	6	14	66.584	5.9736	11.15	<,0001
Trat * Tiempo	5	0	6	21	37.508	6.2866	5.97	<,0001
Trat * Tiempo	5	0	4	0	4.794	4.459	1.08	1
Trat * Tiempo	5	0	4	3	0.822	6.3507	0.13	1
Trat * Tiempo	5	0	4	7	-1.648	4.2927	-0.38	1
Trat * Tiempo	5	0	4	14	5.868	5.9736	0.98	1
Trat * Tiempo	5	0	4	21	14.158	6.2866	2.25	0.939
Trat * Tiempo	5	0	3	0	3.836	4.459	0.86	1
Trat * Tiempo	5	0	3	3	14.428	6.3507	2.27	0.9329
Trat * Tiempo	5	0	3	7	-1.106	4.2927	-0.26	1
Trat * Tiempo	5	0	3	14	4.928	5.9736	0.82	1
Trat * Tiempo	5	0	3	21	16.856	6.2866	2.68	0.7124
Trat * Tiempo	5	0	2	0	2.454	4.459	0.55	1
Trat * Tiempo	5	0	2	3	20.114	6.3507	3.17	0.3467
Trat * Tiempo	5	0	2	7	30.468	4.2927	7.1	<,0001
Trat * Tiempo	5	0	2	14	30.194	5.9736	5.05	0.0008
Trat * Tiempo	5	0	2	21	24.728	6.2866	3.93	0.0494
Trat * Tiempo	5	3	5	7	-1.436	6.5148	-0.22	1

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	5	3	5	14	7.57	7.38	1.03	1
Trat * Tiempo	5	3	5	21	14.55	6.8262	2.13	0.9681
Trat * Tiempo	5	3	6	0	3.592	6.3507	0.57	1
Trat * Tiempo	5	3	6	3	74.812	7.7962	9.6	<,0001
Trat * Tiempo	5	3	6	7	77.058	6.2351	12.36	<,0001
Trat * Tiempo	5	3	6	14	69.042	7.4922	9.22	<,0001
Trat * Tiempo	5	3	6	21	39.966	7.7441	5.16	0.0005
Trat * Tiempo	5	3	4	0	7.252	6.3507	1.14	1
Trat * Tiempo	5	3	4	3	3.28	7.7962	0.42	1
Trat * Tiempo	5	3	4	7	0.81	6.2351	0.13	1
Trat * Tiempo	5	3	4	14	8.326	7.4922	1.11	1
Trat * Tiempo	5	3	4	21	16.616	7.7441	2.15	0.9654
Trat * Tiempo	5	3	3	0	6.294	6.3507	0.99	1
Trat * Tiempo	5	3	3	3	16.886	7.7962	2.17	0.9612
Trat * Tiempo	5	3	3	7	1.352	6.2351	0.22	1
Trat * Tiempo	5	3	3	14	7.386	7.4922	0.99	1
Trat * Tiempo	5	3	3	21	19.314	7.7441	2.49	0.8344
Trat * Tiempo	5	3	2	0	4.912	6.3507	0.77	1
Trat * Tiempo	5	3	2	3	22.572	7.7962	2.9	0.5484
Trat * Tiempo	5	3	2	7	32.926	6.2351	5.28	0.0003
Trat * Tiempo	5	3	2	14	32.652	7.4922	4.36	0.0121
Trat * Tiempo	5	3	2	21	27.186	7.7441	3.51	0.1613
Trat * Tiempo	5	7	5	14	9.006	3.438	2.62	0.7558
Trat * Tiempo	5	7	5	21	15.986	4.6056	3.47	0.1779
Trat * Tiempo	5	7	6	0	5.028	4.2927	1.17	1
Trat * Tiempo	5	7	6	3	76.248	6.2351	12.23	<,0001
Trat * Tiempo	5	7	6	7	78.494	4.1197	19.05	<,0001
Trat * Tiempo	5	7	6	14	70.478	5.8505	12.05	<,0001
Trat * Tiempo	5	7	6	21	41.402	6.1697	6.71	<,0001
Trat * Tiempo	5	7	4	0	8.688	4.2927	2.02	0.9839
Trat * Tiempo	5	7	4	3	4.716	6.2351	0.76	1
Trat * Tiempo	5	7	4	7	2.246	4.1197	0.55	1
Trat * Tiempo	5	7	4	14	9.762	5.8505	1.67	0.9993
Trat * Tiempo	5	7	4	21	18.052	6.1697	2.93	0.5244
Trat * Tiempo	5	7	3	0	7.73	4.2927	1.8	0.9973
Trat * Tiempo	5	7	3	3	18.322	6.2351	2.94	0.5145
Trat * Tiempo	5	7	3	7	2.788	4.1197	0.68	1
Trat * Tiempo	5	7	3	14	8.822	5.8505	1.51	0.9999
Trat * Tiempo	5	7	3	21	20.75	6.1697	3.36	0.2294
Trat * Tiempo	5	7	2	0	6.348	4.2927	1.48	0.9999

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	5	7	2	3	24.008	6.2351	3.85	0.0634
Trat * Tiempo	5	7	2	7	34.362	4.1197	8.34	<,0001
Trat * Tiempo	5	7	2	14	34.088	5.8505	5.83	<,0001
Trat * Tiempo	5	7	2	21	28.622	6.1697	4.64	0.0043
Trat * Tiempo	5	14	5	21	6.98	4.1048	1.7	0.999
Trat * Tiempo	5	14	6	0	-3.978	5.9736	-0.67	1
Trat * Tiempo	5	14	6	3	67.242	7.4922	8.97	<,0001
Trat * Tiempo	5	14	6	7	69.488	5.8505	11.88	<,0001
Trat * Tiempo	5	14	6	14	61.472	7.1754	8.57	<,0001
Trat * Tiempo	5	14	6	21	32.396	7.4379	4.36	0.0122
Trat * Tiempo	5	14	4	0	-0.318	5.9736	-0.05	1
Trat * Tiempo	5	14	4	3	-4.29	7.4922	-0.57	1
Trat * Tiempo	5	14	4	7	-6.76	5.8505	-1.16	1
Trat * Tiempo	5	14	4	14	0.756	7.1754	0.11	1
Trat * Tiempo	5	14	4	21	9.046	7.4379	1.22	1
Trat * Tiempo	5	14	3	0	-1.276	5.9736	-0.21	1
Trat * Tiempo	5	14	3	3	9.316	7.4922	1.24	1
Trat * Tiempo	5	14	3	7	-6.218	5.8505	-1.06	1
Trat * Tiempo	5	14	3	14	-0.184	7.1754	-0.03	1
Trat * Tiempo	5	14	3	21	11.744	7.4379	1.58	0.9997
Trat * Tiempo	5	14	2	0	-2.658	5.9736	-0.44	1
Trat * Tiempo	5	14	2	3	15.002	7.4922	2	0.9861
Trat * Tiempo	5	14	2	7	25.356	5.8505	4.33	0.0132
Trat * Tiempo	5	14	2	14	25.082	7.1754	3.5	0.1675
Trat * Tiempo	5	14	2	21	19.616	7.4379	2.64	0.7436
Trat * Tiempo	5	21	6	0	-10.958	6.2866	-1.74	0.9984
Trat * Tiempo	5	21	6	3	60.262	7.7441	7.78	<,0001
Trat * Tiempo	5	21	6	7	62.508	6.1697	10.13	<,0001
Trat * Tiempo	5	21	6	14	54.492	7.4379	7.33	<,0001
Trat * Tiempo	5	21	6	21	25.416	7.6915	3.3	0.2614
Trat * Tiempo	5	21	4	0	-7.298	6.2866	-1.16	1
Trat * Tiempo	5	21	4	3	-11.27	7.7441	-1.46	1
Trat * Tiempo	5	21	4	7	-13.74	6.1697	-2.23	0.9463
Trat * Tiempo	5	21	4	14	-6.224	7.4379	-0.84	1
Trat * Tiempo	5	21	4	21	2.066	7.6915	0.27	1
Trat * Tiempo	5	21	3	0	-8.256	6.2866	-1.31	1
Trat * Tiempo	5	21	3	3	2.336	7.7441	0.3	1
Trat * Tiempo	5	21	3	7	-13.198	6.1697	-2.14	0.9667
Trat * Tiempo	5	21	3	14	-7.164	7.4379	-0.96	1
Trat * Tiempo	5	21	3	21	4.764	7.6915	0.62	1

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	5	21	2	0	-9.638	6.2866	-1.53	0.9999
Trat * Tiempo	5	21	2	3	8.022	7.7441	1.04	1
Trat * Tiempo	5	21	2	7	18.376	6.1697	2.98	0.4837
Trat * Tiempo	5	21	2	14	18.102	7.4379	2.43	0.8666
Trat * Tiempo	5	21	2	21	12.636	7.6915	1.64	0.9995
Trat * Tiempo	6	0	6	3	71.22	5.3755	13.25	<,0001
Trat * Tiempo	6	0	6	7	73.466	2.5227	29.12	<,0001
Trat * Tiempo	6	0	6	14	65.45	3.6921	17.73	<,0001
Trat * Tiempo	6	0	6	21	36.374	4.0144	9.06	<,0001
Trat * Tiempo	6	0	4	0	3.66	4.459	0.82	1
Trat * Tiempo	6	0	4	3	-0.312	6.3507	-0.05	1
Trat * Tiempo	6	0	4	7	-2.782	4.2927	-0.65	1
Trat * Tiempo	6	0	4	14	4.734	5.9736	0.79	1
Trat * Tiempo	6	0	4	21	13.024	6.2866	2.07	0.9779
Trat * Tiempo	6	0	3	0	2.702	4.459	0.61	1
Trat * Tiempo	6	0	3	3	13.294	6.3507	2.09	0.9747
Trat * Tiempo	6	0	3	7	-2.24	4.2927	-0.52	1
Trat * Tiempo	6	0	3	14	3.794	5.9736	0.64	1
Trat * Tiempo	6	0	3	21	15.722	6.2866	2.5	0.8305
Trat * Tiempo	6	0	2	0	1.32	4.459	0.3	1
Trat * Tiempo	6	0	2	3	18.98	6.3507	2.99	0.4758
Trat * Tiempo	6	0	2	7	29.334	4.2927	6.83	<,0001
Trat * Tiempo	6	0	2	14	29.06	5.9736	4.86	0.0018
Trat * Tiempo	6	0	2	21	23.594	6.2866	3.75	0.0842
Trat * Tiempo	6	3	6	7	2.246	6.5148	0.34	1
Trat * Tiempo	6	3	6	14	-5.77	7.38	-0.78	1
Trat * Tiempo	6	3	6	21	-34.846	6.8262	-5.1	0.0007
Trat * Tiempo	6	3	4	0	-67.56	6.3507	-10.64	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	4	3	-71.532	7.7962	-9.18	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	4	7	-74.002	6.2351	-11.87	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	4	14	-66.486	7.4922	-8.87	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	4	21	-58.196	7.7441	-7.51	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	3	0	-68.518	6.3507	-10.79	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	3	3	-57.926	7.7962	-7.43	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	3	7	-73.46	6.2351	-11.78	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	3	14	-67.426	7.4922	-9	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	3	21	-55.498	7.7441	-7.17	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	2	0	-69.9	6.3507	-11.01	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	2	3	-52.24	7.7962	-6.7	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	2	7	-41.886	6.2351	-6.72	<,0001

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	6	3	2	14	-42.16	7.4922	-5.63	<,0001
Trat * Tiempo	6	3	2	21	-47.626	7.7441	-6.15	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	6	14	-8.016	3.438	-2.33	0.9118
Trat * Tiempo	6	7	6	21	-37.092	4.6056	-8.05	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	4	0	-69.806	4.2927	-16.26	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	4	3	-73.778	6.2351	-11.83	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	4	7	-76.248	4.1197	-18.51	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	4	14	-68.732	5.8505	-11.75	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	4	21	-60.442	6.1697	-9.8	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	3	0	-70.764	4.2927	-16.48	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	3	3	-60.172	6.2351	-9.65	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	3	7	-75.706	4.1197	-18.38	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	3	14	-69.672	5.8505	-11.91	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	3	21	-57.744	6.1697	-9.36	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	2	0	-72.146	4.2927	-16.81	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	2	3	-54.486	6.2351	-8.74	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	2	7	-44.132	4.1197	-10.71	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	2	14	-44.406	5.8505	-7.59	<,0001
Trat * Tiempo	6	7	2	21	-49.872	6.1697	-8.08	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	6	21	-29.076	4.1048	-7.08	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	4	0	-61.79	5.9736	-10.34	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	4	3	-65.762	7.4922	-8.78	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	4	7	-68.232	5.8505	-11.66	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	4	14	-60.716	7.1754	-8.46	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	4	21	-52.426	7.4379	-7.05	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	3	0	-62.748	5.9736	-10.5	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	3	3	-52.156	7.4922	-6.96	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	3	7	-67.69	5.8505	-11.57	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	3	14	-61.656	7.1754	-8.59	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	3	21	-49.728	7.4379	-6.69	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	2	0	-64.13	5.9736	-10.74	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	2	3	-46.47	7.4922	-6.2	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	2	7	-36.116	5.8505	-6.17	<,0001
Trat * Tiempo	6	14	2	14	-36.39	7.1754	-5.07	0.0008
Trat * Tiempo	6	14	2	21	-41.856	7.4379	-5.63	<,0001
Trat * Tiempo	6	21	4	0	-32.714	6.2866	-5.2	0.0005
Trat * Tiempo	6	21	4	3	-36.686	7.7441	-4.74	0.003
Trat * Tiempo	6	21	4	7	-39.156	6.1697	-6.35	<,0001
Trat * Tiempo	6	21	4	14	-31.64	7.4379	-4.25	0.0174
Trat * Tiempo	6	21	4	21	-23.35	7.6915	-3.04	0.4402

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	6	21	3	0	-33.672	6.2866	-5.36	0.0002
Trat * Tiempo	6	21	3	3	-23.08	7.7441	-2.98	0.4822
Trat * Tiempo	6	21	3	7	-38.614	6.1697	-6.26	<,0001
Trat * Tiempo	6	21	3	14	-32.58	7.4379	-4.38	0.0112
Trat * Tiempo	6	21	3	21	-20.652	7.6915	-2.69	0.7097
Trat * Tiempo	6	21	2	0	-35.054	6.2866	-5.58	<,0001
Trat * Tiempo	6	21	2	3	-17.394	7.7441	-2.25	0.9408
Trat * Tiempo	6	21	2	7	-7.04	6.1697	-1.14	1
Trat * Tiempo	6	21	2	14	-7.314	7.4379	-0.98	1
Trat * Tiempo	6	21	2	21	-12.78	7.6915	-1.66	0.9993
Trat * Tiempo	4	0	4	3	-3.972	5.3755	-0.74	1
Trat * Tiempo	4	0	4	7	-6.442	2.5227	-2.55	0.7989
Trat * Tiempo	4	0	4	14	1.074	3.6921	0.29	1
Trat * Tiempo	4	0	4	21	9.364	4.0144	2.33	0.9114
Trat * Tiempo	4	0	3	0	-0.958	4.459	-0.21	1
Trat * Tiempo	4	0	3	3	9.634	6.3507	1.52	0.9999
Trat * Tiempo	4	0	3	7	-5.9	4.2927	-1.37	1
Trat * Tiempo	4	0	3	14	0.134	5.9736	0.02	1
Trat * Tiempo	4	0	3	21	12.062	6.2866	1.92	0.9925
Trat * Tiempo	4	0	2	0	-2.34	4.459	-0.52	1
Trat * Tiempo	4	0	2	3	15.32	6.3507	2.41	0.877
Trat * Tiempo	4	0	2	7	25.674	4.2927	5.98	<,0001
Trat * Tiempo	4	0	2	14	25.4	5.9736	4.25	0.0175
Trat * Tiempo	4	0	2	21	19.934	6.2866	3.17	0.3442
Trat * Tiempo	4	3	4	7	-2.47	6.5148	-0.38	1
Trat * Tiempo	4	3	4	14	5.046	7.38	0.68	1
Trat * Tiempo	4	3	4	21	13.336	6.8262	1.95	0.9902
Trat * Tiempo	4	3	3	0	3.014	6.3507	0.47	1
Trat * Tiempo	4	3	3	3	13.606	7.7962	1.75	0.9984
Trat * Tiempo	4	3	3	7	-1.928	6.2351	-0.31	1
Trat * Tiempo	4	3	3	14	4.106	7.4922	0.55	1
Trat * Tiempo	4	3	3	21	16.034	7.7441	2.07	0.9781
Trat * Tiempo	4	3	2	0	1.632	6.3507	0.26	1
Trat * Tiempo	4	3	2	3	19.292	7.7962	2.47	0.8452
Trat * Tiempo	4	3	2	7	29.646	6.2351	4.75	0.0028
Trat * Tiempo	4	3	2	14	29.372	7.4922	3.92	0.0514
Trat * Tiempo	4	3	2	21	23.906	7.7441	3.09	0.4026
Trat * Tiempo	4	7	4	14	7.516	3.438	2.19	0.9566
Trat * Tiempo	4	7	4	21	15.806	4.6056	3.43	0.1955
Trat * Tiempo	4	7	3	0	5.484	4.2927	1.28	1

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	4	7	3	3	16.076	6.2351	2.58	0.7833
Trat * Tiempo	4	7	3	7	0.542	4.1197	0.13	1
Trat * Tiempo	4	7	3	14	6.576	5.8505	1.12	1
Trat * Tiempo	4	7	3	21	18.504	6.1697	3	0.4678
Trat * Tiempo	4	7	2	0	4.102	4.2927	0.96	1
Trat * Tiempo	4	7	2	3	21.762	6.2351	3.49	0.1697
Trat * Tiempo	4	7	2	7	32.116	4.1197	7.8	<.0001
Trat * Tiempo	4	7	2	14	31.842	5.8505	5.44	0.0002
Trat * Tiempo	4	7	2	21	26.376	6.1697	4.28	0.0162
Trat * Tiempo	4	14	4	21	8.29	4.1048	2.02	0.9843
Trat * Tiempo	4	14	3	0	-2.032	5.9736	-0.34	1
Trat * Tiempo	4	14	3	3	8.56	7.4922	1.14	1
Trat * Tiempo	4	14	3	7	-6.974	5.8505	-1.19	1
Trat * Tiempo	4	14	3	14	-0.94	7.1754	-0.13	1
Trat * Tiempo	4	14	3	21	10.988	7.4379	1.48	0.9999
Trat * Tiempo	4	14	2	0	-3.414	5.9736	-0.57	1
Trat * Tiempo	4	14	2	3	14.246	7.4922	1.9	0.9935
Trat * Tiempo	4	14	2	7	24.6	5.8505	4.2	0.0206
Trat * Tiempo	4	14	2	14	24.326	7.1754	3.39	0.2156
Trat * Tiempo	4	14	2	21	18.86	7.4379	2.54	0.81
Trat * Tiempo	4	21	3	0	-10.322	6.2866	-1.64	0.9995
Trat * Tiempo	4	21	3	3	0.27	7.7441	0.03	1
Trat * Tiempo	4	21	3	7	-15.264	6.1697	-2.47	0.8455
Trat * Tiempo	4	21	3	14	-9.23	7.4379	-1.24	1
Trat * Tiempo	4	21	3	21	2.698	7.6915	0.35	1
Trat * Tiempo	4	21	2	0	-11.704	6.2866	-1.86	0.9953
Trat * Tiempo	4	21	2	3	5.956	7.7441	0.77	1
Trat * Tiempo	4	21	2	7	16.31	6.1697	2.64	0.7393
Trat * Tiempo	4	21	2	14	16.036	7.4379	2.16	0.9633
Trat * Tiempo	4	21	2	21	10.57	7.6915	1.37	1
Trat * Tiempo	3	0	3	3	10.592	5.3755	1.97	0.9889
Trat * Tiempo	3	0	3	7	-4.942	2.5227	-1.96	0.9898
Trat * Tiempo	3	0	3	14	1.092	3.6921	0.3	1
Trat * Tiempo	3	0	3	21	13.02	4.0144	3.24	0.2976
Trat * Tiempo	3	0	2	0	-1.382	4.459	-0.31	1
Trat * Tiempo	3	0	2	3	16.278	6.3507	2.56	0.793
Trat * Tiempo	3	0	2	7	26.632	4.2927	6.2	<.0001
Trat * Tiempo	3	0	2	14	26.358	5.9736	4.41	0.01
Trat * Tiempo	3	0	2	21	20.892	6.2866	3.32	0.2508
Trat * Tiempo	3	3	3	7	-15.534	6.5148	-2.38	0.8899

Effect	Trat	Tiempo	Trat	Tiempo	Estimate	Standard Error	t Value	AdjP
Trat * Tiempo	3	3	3	14	-9.5	7.38	-1.29	1
Trat * Tiempo	3	3	3	21	2.428	6.8262	0.36	1
Trat * Tiempo	3	3	2	0	-11.974	6.3507	-1.89	0.9943
Trat * Tiempo	3	3	2	3	5.686	7.7962	0.73	1
Trat * Tiempo	3	3	2	7	16.04	6.2351	2.57	0.787
Trat * Tiempo	3	3	2	14	15.766	7.4922	2.1	0.9729
Trat * Tiempo	3	3	2	21	10.3	7.7441	1.33	1
Trat * Tiempo	3	7	3	14	6.034	3.438	1.76	0.9982
Trat * Tiempo	3	7	3	21	17.962	4.6056	3.9	0.0547
Trat * Tiempo	3	7	2	0	3.56	4.2927	0.83	1
Trat * Tiempo	3	7	2	3	21.22	6.2351	3.4	0.2091
Trat * Tiempo	3	7	2	7	31.574	4.1197	7.66	<,0001
Trat * Tiempo	3	7	2	14	31.3	5.8505	5.35	0.0002
Trat * Tiempo	3	7	2	21	25.834	6.1697	4.19	0.0218
Trat * Tiempo	3	14	3	21	11.928	4.1048	2.91	0.54
Trat * Tiempo	3	14	2	0	-2.474	5.9736	-0.41	1
Trat * Tiempo	3	14	2	3	15.186	7.4922	2.03	0.9835
Trat * Tiempo	3	14	2	7	25.54	5.8505	4.37	0.0118
Trat * Tiempo	3	14	2	14	25.266	7.1754	3.52	0.1571
Trat * Tiempo	3	14	2	21	19.8	7.4379	2.66	0.7262
Trat * Tiempo	3	21	2	0	-14.402	6.2866	-2.29	0.9266
Trat * Tiempo	3	21	2	3	3.258	7.7441	0.42	1
Trat * Tiempo	3	21	2	7	13.612	6.1697	2.21	0.9517
Trat * Tiempo	3	21	2	14	13.338	7.4379	1.79	0.9975
Trat * Tiempo	3	21	2	21	7.872	7.6915	1.02	1
Trat * Tiempo	2	0	2	3	17.66	5.3755	3.29	0.2724
Trat * Tiempo	2	0	2	7	28.014	2.5227	11.1	<,0001
Trat * Tiempo	2	0	2	14	27.74	3.6921	7.51	<,0001
Trat * Tiempo	2	0	2	21	22.274	4.0144	5.55	0.0001
Trat * Tiempo	2	3	2	7	10.354	6.5148	1.59	0.9997
Trat * Tiempo	2	3	2	14	10.08	7.38	1.37	1
Trat * Tiempo	2	3	2	21	4.614	6.8262	0.68	1
Trat * Tiempo	2	7	2	14	-0.274	3.438	-0.08	1
Trat * Tiempo	2	7	2	21	-5.74	4.6056	-1.25	1
Trat * Tiempo	2	14	2	21	-5.466	4.1048	-1.33	1