

Grao en Bioloxía

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio del aprovechamiento de los residuos del café como potencial producto fitosanitario, bioestimulante y/o fertilizante

Estudo do aproveitamento dos residuos do café como potencial produto fitosanitario, bioestimulante e/ou fertilizante

Study of the use of coffee waste as a potential phytosanitary, biostimulant and/or fertilizer product



David Rodríguez Ramos
Junio 2021

*Directores : José Díaz Varela
Javier Veloso Freire*

D. JOSÉ DÍAZ VARELA, CATEDRÁTICO DE FISIOLOXÍA VEXETAL, DOUTOR EN BIOLOXÍA, E D. JAVIER VELOSO FREIRE, CONTRATADO POSDOUTORAL, DOUTOR EN BIOLOXÍA, DO DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA DA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que o presente Traballo de Fin de Grado presentado polo alumno DAVID RODRÍGUEZ RAMOS e titulado

“Estudio del aprovechamiento de los residuos del café como potencial producto fitosanitario, bioestimulante y/o fertilizante”

“Estudo do aproveitamento dos residuos do café como potencial produto fitosanitario, bioestimulante e/ou fertilizante”

“Study of the use of coffee waste as a potential phytosanitary, biostimulant and/or fertilizer product”

foi realizado baixo a súa dirección e autorizan a súa presentación para que poida ser xulgado polo tribunal correspondente.

E para que así conste, expiden e asinan o presente informe en A Coruña, a 25 de Xuño de 2021.



Asdo. José Díaz Varela



Asdo. Javier Veloso Freire

Índice

Resumen/Resumo/Summary	
Palabras clave/Palabras chave/Key words	
1. Introducción.....	1
1.1 La planta de café	1
1.2 Historia del café	2
1.3 Producción del grano de café	2
1.4 Economía y procesado del café.....	3
1.5 Los residuos del café como una futura oportunidad	6
2 Objetivos:	8
3 Material y métodos	8
3.1 Material vegetal	8
3.2 Material fúngico	9
3.3 Puntos comunes	9
3.4 Estudio del efecto del tratamiento con residuos de café sobre la germinación en pimiento	9
3.5 Estudio del efecto de tratamientos con residuos de café en la resistencia del pimiento a <i>Botrytis cinerea</i>	10
3.6 Estudio del efecto de tratamientos con residuos de café sobre el crecimiento de pimiento, tomate y lechuga	11
3.7 Análisis estadístico	11
4 Resultados	12
4.1 Estudio del efecto del tratamiento con residuos de café sobre la germinación en pimiento	12
4.2 Estudio del efecto de tratamientos con residuos de café en la resistencia del pimiento a <i>Botrytis cinerea</i>	13
4.3 Estudio del efecto de tratamientos con residuos de café sobre el crecimiento de pimiento, tomate y lechuga	14
5 Discusión.....	17
6. Conclusiones/Conclusións/Conclusions	20
7. Bibliografía	21

Resumen

La enorme demanda de café a nivel global y su propia naturaleza generan una gran cantidad de residuos. A día de hoy, numerosos estudios de los más variados ámbitos tratan de encontrar una forma de aprovechar estos restos. En este trabajo se han estudiado los posibles efectos de las borras de café sobre plantas cultivadas, ya sea a modo de fitosanitario, bioestimulante o fertilizante. Para ello, se ha estudiado su efecto sobre la germinación de pimiento (*Capsicum annuum* L.) e infección causada por *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. en pimiento, así como su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de pimiento, lechuga (*Lactuca sativa* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Los resultados muestran una reducción de la germinación y del crecimiento, así como una reducción de los síntomas causados por el patógeno empleado.

Resumo

A enorme demanda de café a nivel global e a súa propia natureza xeran unha gran cantidade de residuos. A día de hoxe, numerosos estudos dos máis variados ámbitos tratan de atopar unha forma de aproveitar estes restos. Neste traballo estudáronse os posibles efectos das borras de café sobre plantas cultivadas, xa sexa a modo de fitosanitario, bioestimulante ou fertilizante. Para isto, estudouse o seu efecto sobre a xerminación do pemento (*Capsicum annuum* L.) e infección causada por *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. en pemento, así como o seu efecto sobre o crecemento e o desenvolvemento do pemento, da leituga (*Lactuca sativa* L.) e do tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Os resultados mostran unha redución da xerminación e o crecemento, así coma unha redución dos síntomas causados polo patóxeno empregado.

Summary

The high global demand for coffee and its own nature generate high amounts of waste. Nowadays, many studies from very diverse areas try to find a way to use these residues. In this study the possible effects of the spent coffee grounds on crop plants have been studied, either as phytosanitary, biostimulant or fertilizer. In order to check this, the effects on pepper (*Capsicum annuum* L.) germination and infection caused by

Botrytis cinerea Pers.: Fr. in pepper have been studied, as well as the effect on growth and development of pepper, lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Results show a high reduction of germination and growth, as well as a reduction of the symptoms caused by the pathogen mentioned above.

Palabras clave

Residuos de café, germinación, inducción de resistencia, desarrollo vegetal.

Palabras chave

Residuos de café, xerminación, indución de resistencia, desenvolvimento vexetal.

Key words

Coffee residues, germination, induced resistance, plant development.

1. Introducción

1.1 La planta de café

El café es uno de los productos de origen vegetal más importantes económicamente a nivel mundial, siendo la bebida más consumida por el ser humano. Esta bebida se elabora a partir de los granos (semillas) de plantas del género *Coffea* (también llamadas cafetos). Se trata de un grupo de plantas leñosas cuyo aspecto puede variar desde pequeños arbustos hasta árboles de más de 10 metros de altura (International Coffee Organisation, s. f. a). Pertenecen a la familia Rubiaceae, y las especies de mayor importancia comercial son *Coffea arabica* L. (Figura 1) y *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, las cuales producen las variedades de café denominadas arábica y robusta, respectivamente (Mussatto et al., 2011). Cabe destacar también *Coffea liberica* Hiern, de la que se obtiene un producto de menor calidad. A modo de comparativa, *Coffea arabica* es descrito como un arbusto de gran tamaño y raíces profundas, mientras que a *Coffea canephora* se le considera un arbusto o árbol compacto con raíces que alcanzan menores profundidades. En contraposición, *Coffea liberica* es un árbol que puede alcanzar los 18 metros de altura. Entre los dos más cultivados, podemos observar cómo *Coffea canephora* muestra una mayor resistencia a diversos patógenos y presenta niveles mayores de cafeína en el grano que *Coffea arabica* (International Coffee Organization, s. f. a).



Figura 1: A: Morfología de *Coffea arabica*. Extraído de "Planta del café (*Coffea arabica*)" de copepodo, 2007, Flickr (<https://www.flickr.com/photos/63661371@N00/2641227427>). CC BY-NC-ND 2.0. B: Fruto y grano de *Coffea arabica* (Extraído de: "Coffea arabica Café 5", de RVCTA Imágenes, 2015, Flickr (<https://www.flickr.com/photos/rvcta/20948094413/>)). CC0 1.0.

1.2 Historia del café

El origen del café se localiza, probablemente, en el Cuerno de África, en la región de Kaffa, Etiopía. Su consumo se limitaba a la parte carnosa del fruto del cafeto, aprovechado por los esclavos que eran transportados desde Sudán a Yemen y Arabia (International Coffee Organization, s. f. b). En Yemen, los escritos más antiguos que hacen referencia al café datan del año 575. Sin embargo, el tostado de los granos de café no surgió hasta el siglo XVI en Persia (Mussatto et al., 2011). Previamente, también existen referencias a su consumo en forma de tortas prensadas (Arneson & Ordóñez, 2000). La mayor vía de comercio de café era el puerto de Moca (cuyo nombre adquirió posteriormente una bebida fruto de la mezcla de café y chocolate), si bien las políticas de comercio de granos eran estrictas. Diversas medidas impedían la exportación de semillas fértiles de café, con el objetivo de evitar su producción en otros países (International Coffee Organization, s. f. b). A lo largo de la historia numerosos países trataron de conseguir tan valioso producto, pero finalmente fue Holanda la que logró obtener granos fértiles. En torno a 1615, se cultivaron por primera vez plantas de cafeto en Europa, en el Jardín Botánico de Ámsterdam. Posteriormente, los holandeses extendieron semillas viables por Europa, comenzando por Francia, y más tarde llegó, primero a América y finalmente, a Asia (International Coffee Organization, s. f. b; Mussatto et al., 2011). Curiosamente, estas dos últimas regiones son aquellas donde más café se produce hoy en día. En Europa, el café comenzó siendo un producto tan solo consumido por gente rica, si bien con el tiempo acabó llegando a grupos más humildes. Las cafeterías fueron escenario de discusiones sobre política, filosofía y religión, lo que hizo a estas y al café tener un importante papel a nivel político, social y cultural (Arneson & Ordóñez, 2000).

1.3 Producción del grano de café

El 80% de la producción de café se origina en tan solo 10 países. Sudamérica es la región donde mayor es el cultivo de café, contando con un 43% de la producción. Le siguen Asia (24%), Centroamérica (18%) y África (16%) (Mussatto et al., 2011). En la Figura 2 podemos observar los países productores más importantes. Brasil encabeza la lista de los cuatro mayores productores, con 3.009.402 toneladas de café verde, repartidas en 1.823.403 hectáreas. Le sigue Vietnam, con 1.683.971 toneladas

y 622.637 hectáreas; y Colombia, contando con 885.120 toneladas y 853.700 hectáreas. Finalmente, Indonesia produce 760.963 toneladas de café verde y 1.258.032 hectáreas (FAOSTAT, s. f.). Entre los dos tipos de café más cultivados, el 75% de la producción es de arábica y el 25% de robusta (Mussatto et al, 2011).

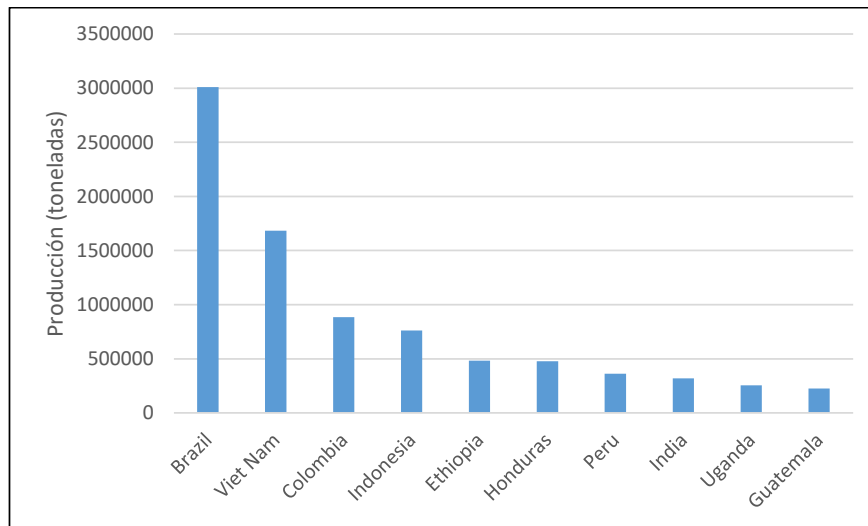


Figura 2: Países que más café verde produjeron en 2019. Modificado de:
<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>

Según el informe de mercado de café de febrero de 2021 elaborado por la International Coffee Organisation, en el año cafetero 2019-2020 (un año cafetero consiste en el período de tiempo que va desde el 1 de octubre al 30 de septiembre del siguiente año), la producción de café verde se elevó a, aproximadamente, 168,7 millones de sacos de 60 Kg.

1.4 Economía y procesado del café

El comercio del café mueve grandes cantidades de dinero. En 2019 un kilogramo de café verde costó, de media, 2,2 dólares americanos. La Figura 3 representa la evolución del café verde en los últimos 20 años. El café osciló entre la media anual más baja (2001), valiendo 0,99 dólares el kilo, y la más alta (2011), valiendo 4,63 dólares el kilo (International Coffee Organization, 2020).

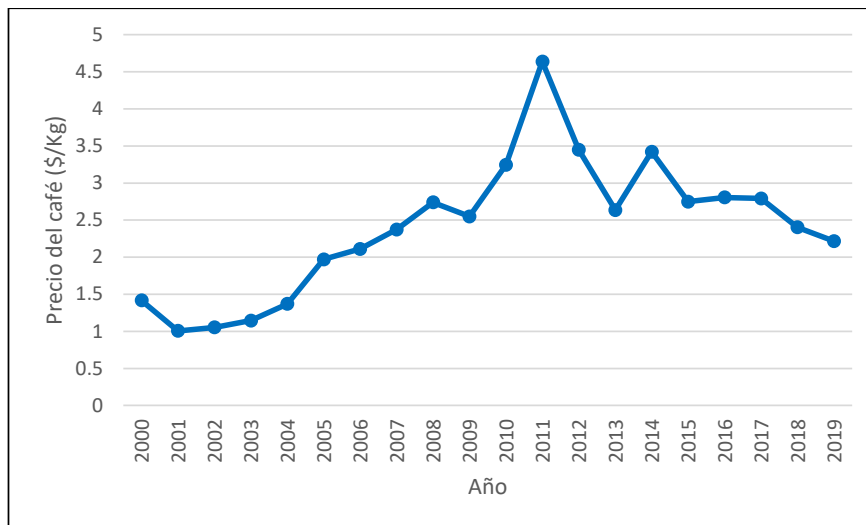


Figura 3: Precio del café en dolares americanos por kg en el período 2000-2019. Modificado de: <https://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/3c-indicator-prices.pdf>

Para poder comercializar el café, este debe procesarse previamente. Este procesado consiste en la extracción de varias capas que rodean el grano. El fruto del cafeto está compuesto por dos semillas con forma elíptica (las cuales contienen el embrión y el endospermo) envueltas en cuatro tipos de tejido. El tejido más externo, el exocarpo (denominado en este caso piel) está compuesto por una capa única de células protegida por una sustancia cerosa. Su color verde pasa a adquirir un color rojo, naranja o amarillo una vez está maduro el fruto. Interior al exocarpo, se halla el mesocarpo, una pulpa carnosa. En cuanto su composición, es rica en carbohidratos, grasas, proteínas, lípidos y minerales. También son destacables las cantidades de taninos, cafeína y polifenoles. En frutos maduros aparece una envuelta de mucílago. El tercer manto es el endocarpo, también denominado pergamino, una fina capa compuesta de polisacáridos. Finalmente, la capa más interna es la cascarilla, un fino tegumento que se halla en contacto con las semillas (Alves et al., 2017; de Melo Pereira et al., 2019). La eliminación de dichas capas va a realizarse mediante diferentes técnicas, que varían, entre otras cosas, en función del país de cultivo (razones culturales y económicas, climatología...) y dependiendo de la variedad de café (robusta, arábica...).

Los dos tipos de procesado más importantes son el seco y el húmedo. En el primer caso se puede emplear cualquier fruto independientemente de su madurez, mientras

que en el segundo caso deben emplearse frutos maduros (Alves et al., 2017; Bytof et al., 2005). En ambos casos, el paso de la recogida al procesado debe ser rápido, para evitar daños en el fruto por aparición de moho o fermentación (Alves et al., 2017; de Melo Pereira et al., 2019). Si este se retrasa, pueden reducirse la calidad del producto final (Velmourougane et al., 2011). En el caso del procesado seco, típico del café robusta, se dispone una fina capa de frutos completos, de forma que puedan ser secados al aire o mediante el empleo de secadores mecánicos (por ejemplo, en el caso de que las condiciones climáticas desaconsejen el secado al aire). Posteriormente, cuando el porcentaje de agua en el fruto es del 12%, se procede a descascarillar. El procesado húmedo es mucho más complejo y da lugar a un grano de mayor calidad. Primero, se extraen mecánicamente la piel y la pulpa. A continuación, la capa de mucílago presente en los frutos maduros se elimina mediante fermentación microbiana. Durante este proceso, la fermentación alcohólica de los azúcares remanentes de la pulpa incrementará la temperatura, lo que facilita la acción de las pectinasas, que degradarán el mucílago, compuesto principalmente de pectina. Finalmente, se procederá al secado del producto, que, tras 6 días, baja su contenido en agua al 12% (Alves et al., 2017; Bytof et al., 2005; de Melo Pereira et al., 2019; Mussatto et al., 2011). Existen también otros procesados, como el semiseco o semihúmedo, en que se mezclan los procesos anteriores, seleccionando los frutos, quitando la piel y pulpa y finalmente secando al sol, sin el paso de la fermentación; o la eliminación del mucílago por fricción empleando fuerzas mecánicas (Alves et al., 2017).

Una vez obtenido el grano, este ya puede ser tostado y molido (dependiendo de la forma en la que se comercialice). Este proceso suele llevarse a cabo en el país que importa dichas semillas para así conservar las características organolépticas de una forma idónea. Previamente se eliminan granos inadecuados para su tostado y fragmentos de piedra o metal que puedan ir entre ellos. El tostado puede realizarse de diferentes formas, si bien actualmente es común la aplicación de flujos de gases calientes sobre una capa de grano (Alves et al., 2017). A continuación, se enfrían rápidamente para así evitar el tostado excesivo y frenar las reacciones exotérmicas (Mussatto et al., 2011).

El procesado del café no solo lo prepara para el consumo, sino que, según Mekonen et al. (2015), puede eliminar la mayor parte de los pesticidas que pueda haber en el

producto. Concretamente, de los 14 pesticidas empleados en dicho estudio, se observó una reducción del 14,73% al 57,69% tras el lavado, y una reducción del 99,8% tras el tostado.

Previo al tostado de los granos de café, puede reducirse su cantidad de cafeína para así obtener un producto apto para aquellas personas en las que este compuesto esté contraindicado. Esto se consigue mediante un proceso llamado descafeinización, que puede llevarse a cabo de dos formas diferentes: mediante el empleo de solventes orgánicos y mediante el uso de fluidos supercríticos. El primero de los métodos es el más antiguo, en el cual se usa un solvente orgánico, como diclorometano o acetato de etilo, para extraer la cafeína del grano. Debe aumentarse el porcentaje de agua previamente para poder extraer la cafeína, pues esta se halla unida al ácido clorogénico (formando un complejo) en el grano verde de café y precisa de este tratamiento para separarse. Para esto se puede aplicar vapor a alta temperatura, o una combinación de remojo en agua caliente y posterior empleo de vapor. El proceso de extracción puede ser directo (la cafeína se extrae del grano directamente) o indirecto (se extrae la cafeína y numerosos otros compuestos, se separa la primera y se devuelven el resto). Finalmente, se realiza un secado para eliminar el agua o restos de solvente que hayan podido quedar (Farah et al., 2006; Ramalakshmi & Raghavan, 1999). Este método comparte con el del empleo de fluidos supercríticos la necesidad de aumentar el contenido de agua en la semilla. El segundo método consiste en el uso de fluidos a temperaturas y presiones por encima de sus valores críticos, beneficiándose de su alta capacidad para disolver moléculas no polares (Brunner, 2004). Esta característica le confiere numerosos usos potenciales, además de ser la principal forma de extracción de cafeína hoy en día (no solo en el café, también en el té) (Capuzzo et al., 2013). El principal compuesto empleado como solvente es dióxido de carbono (Ramalakshmi & Raghavan, 1999).

1.5 Los residuos del café como una futura oportunidad

Tanto durante el procesado del café como tras su consumo, se generan diversos residuos. En el caso de la descafeinización, existe una opción para llevar a cabo este proceso reduciendo los residuos obtenidos, que consiste en el empleo de microorganismos o enzimas capaces de degradar dicha cafeína de una forma muy específica. Esto proporcionaría numerosos beneficios como la obtención de

numerosos compuestos útiles producto de su degradación (Gummadi et al., 2012; Summers et al., 2015)

El café genera, principalmente, dos tipos de residuos. El primero, generado durante el tostado del producto, son las películas plateadas del café (cascarillas). El otro es denominado poso o borras de café (Figura 4), el cual consiste en un particulado fino producto de la producción de dicha bebida mediante el tratamiento de café molido con agua hirviendo o vapor. Partiendo de una tonelada de granos de café verde, se forman 650 Kg de estas borras de café (Mussatto et al., 2011).



Figura 4: Borras de café (Autoría propia)

Son varias las potenciales aplicaciones que podrían tener las borras de café. Entre ellas, su uso como agregados en la ingeniería civil (Saberian et al., 2021) o transformación en biopolímeros y uso en material de embalaje (Garcia & Kim, 2021). Son destacables su empleo como materia prima en la creación de biocombustible (Xin Jiat et al., 2021); la aplicación de los nanocristales de celulosa que se encuentran en las borras en la ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad (Dutta et al., 2021) o su uso como sustrato de *Escherichia coli* para producir hidrógeno (Petrosyan et al., 2020).

En el campo de la agricultura, los resultados de la aplicación de borras de café varían según la planta tratada y la concentración. Chrysargyris et al. (2021) estudian su efecto en la germinación de semillas de especies del género Brassica, observando que a concentraciones menores del 5% podría funcionar como bioestimulante. Ciesielczuk et al. (2018) emplean fertilizantes basados en diferentes concentraciones de borras de café, sulfato magnésico, cenizas y harina de sangre en diferentes

especies (a saber, *Synapis alba* L., *Triticum sp.* L., *Cucumis sativus* L. y *Lepidium sativum* L.) y concluye que a concentraciones bajas algunas combinaciones pueden estimular el crecimiento de las raíces en algunas especies. Gammoudi et al. (2021) estudiaron el efecto de estos residuos en la germinación *in vitro* de *Capsicum annuum* L. bajo condiciones de estrés (sequía), llegando a la conclusión de que a concentraciones del 2% al 4% de borras secas, la germinación es más rápida. Estos tres artículos tienen un punto en común: a bajas concentraciones, las borras de café pueden tener efectos beneficiosos, si bien, a altas concentraciones, inhiben la germinación y el crecimiento de la planta.

En este trabajo se estudian posibles aplicaciones que pueda tener uno de los residuos previamente mencionados, las borras de café, en el ámbito de la fisiología vegetal.

2 Objetivos:

1.-Conocer el efecto que tienen los tratamientos con borras de café sobre la germinación y crecimiento de *Capsicum annuum* L. (Pimiento) en condiciones controladas.

2.-Comprobar si el tratamiento con borras de café produce algún cambio en la resistencia de *Capsicum annuum* frente a *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.

3.-Conocer el efecto de las borras de café sobre el crecimiento y desarrollo de *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* L. (Tomate) y *Lactuca sativa* L. (Lechuga) en condiciones de invernadero.

3 Material y métodos

3.1 Material vegetal

El material vegetal empleado fue diferente en cada uno de los tres estudios realizados. Para el primer estudio, se emplearon semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. Padrón) comerciales de la marca Battle. Para el segundo, se emplearon plantas del tratamiento control del estudio anterior, las cuales se hallaban lo suficientemente desarrolladas para la inoculación. Finalmente, en el tercer estudio

los materiales vegetales de partida fueron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad RAF (Resistente a *Fusarium*); plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) de la variedad Trocadero; y plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) de la variedad Blanco Rosal. Estas fueron plantas producidas por el vivero Angustia y compradas en Progando.

3.2 Material fúngico

Para la realización del segundo estudio, se empleó el patógeno *Botrytis cinerea*. Para la preparación de la placa de *Botrytis*, se empleó un stock de conidios conservado a -80°C en glicerol (Aislado B0510 proporcionado por el Dr. Jan Van Kan de la Wageningen University, Países Bajos). Se sembraron dos placas de PDA (Patata Dextrosa Agar) con 2 µl del stock con ayuda de un asa de siembra en una cámara de flujo laminar. Tras permitir su crecimiento a temperatura ambiente, se emplearon para repicar otras 4 placas (recortando un cuadrado de 0,5 x 0,5 cm con micelio y depositándolo en el centro de otra placa boca abajo), que tras ser incubadas a temperatura ambiente durante tres días, serían las que se emplearían para la inoculación.

3.3 Aspectos generales

En cada estudio se realizaron dos experimentos independientes. En cuanto al espacio empleado, gran parte del proceso se realizó en laboratorio, creciendo las plantas en una cámara de cultivo (con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 25°C y 8 horas de oscuridad a 18°C). El último ensayo fue realizado en invernadero (condiciones más variables). Las borras empleadas provienen de la preparación de café de la marca Siboney en una cafetera de goteo y su posterior secado en estufa a 60°C. Los tipos empleados son “arábica premium” y “arábica descafeinado”.

3.4 Estudio del efecto del tratamiento con residuos de café sobre la germinación en pimiento

En este primer estudio, se estudiaron los posibles efectos de las borras de café sobre el proceso de la germinación. Se realizaron 3 tratamientos diferentes:

- CO: Control, 750 ml de sustrato marca Pinstруп.
- AC: 600 ml sustrato Pinstруп:150 ml borras de arábica con cafeína.
- DC: 600 ml sustrato Pinstруп:150 ml borras de arábica descafeinado.

Tras agitar bien cada una de las mezclas para así obtener un resultado homogéneo,

se rellenaron 6 macetas con cada uno de los sustratos preparados (tratamientos). Llegados a este punto se introdujeron, de una forma lo más uniforme posible, 15 semillas en cada maceta y se cubrieron de una capa del sustrato correspondiente. Los restos sobrantes se guardaron por si fuesen de utilidad posteriormente. En relación al aporte hídrico, se rellenaron las cubetas en las cuales estaban las macetas con una capa de agua destilada. Finalmente, se introdujeron en la cámara (condiciones descritas en apartado 3.3).

Tras aproximadamente una semana de la siembra, las semillas comenzaron a germinar y se realizó un seguimiento diario de la germinación de estas. Finalmente, tras dos semanas, se midió la altura de 20 plantas seleccionadas aleatoriamente en cada tratamiento con ayuda de un calibre digital y se tomaron fotos.

3.5 Estudio del efecto de tratamientos con residuos de café en la resistencia del pimiento a *Botrytis cinerea*

Para este segundo experimento, se prepararon tres tipos de sustrato:

- CO: 1L de sustrato marca Pinstруп
- AC: 20 g borras de arábica premium mezclado con sustrato Pinstруп hasta llegar a 1L total
- DC: 20 g borras de arábica descafeinado mezclado con sustrato Pinstруп hasta llegar a 1L total

Cada uno se empleó para rellenar 10 macetas (excepto uno de los casos, un tratamiento de la réplica 1, debido a que el pequeño tamaño de dos de las plantas podía comprometer el estudio, por lo que se incorporaron dos plantas por si fuese necesario sustituirlas). Una vez rellenos, se regaron con agua destilada hasta estar saturados, y se transplantaron cada una de las plantas de pimiento. Finalmente, se añadió agua destilada en la cubeta en que se disponían las macetas de cada tratamiento y se introdujeron en cámara a las condiciones especificadas en el apartado 3.3.

Se dejaron crecer hasta que el tamaño de la hoja fuera más adecuado para los pasos siguientes, y se procedió a realizar la inoculación. Para ello, con ayuda de un sacabocados, se obtuvieron discos de agar con micelio de *Botrytis* a partir de una placa preparada previamente con dicho patógeno como se indica en el apartado 2.2 y se depositaron en cada una de las primeras hojas verdaderas. De esta forma, cada

una de las plantas tenía 2 discos, dispuestos de forma que el micelio del hongo contactara con la hoja. Se introdujeron las plantas en cajas plásticas cerradas con una cierta cantidad de agua para asegurar el nivel de humedad relativo a saturación y se llevaron a la cámara. Tras 24 horas comenzaron a aparecer lesiones, y se procedió a medir su diámetro diariamente.

3.6 Estudio del efecto de tratamientos con residuos de café sobre el crecimiento de pimiento, tomate y lechuga

Para el último estudio, se estudió el crecimiento de diferentes especies de plantas cultivadas sometidas a una concentración de borras de café normales y borras de café a las que se les ha realizado un proceso para tratar de extraer cafeína. Al ser el material vegetal productos traídos de un vivero comercial, todo el proceso posterior se realizó en invernadero. En cuanto a los residuos de café sometidos al proceso de extracción, se mezclaron 60 g de borras de arábica premium (con cafeína) secas y se mezclaron con 1,8 l de agua destilada, y se sometió la mezcla a esterilización en autoclave (160°C, 1 Atm.) durante 20 minutos. Posteriormente, tras enfriarse, se realizó un filtrado empleando un filtro de café y se secaron las borras retenidas en el filtro. El residuo sin extraer se preparó introduciendo borras en un matraz erlenmeyer, se autoclavó y secó. Para preparar los sustratos, se mezclaron 40 g de cada uno de los residuos con 4 l de sustrato pinstrup. El control consistió en solamente sustrato pinstrup. Se denominaron CO (Control), CAF (Borras sin tratar) y CEX (Borras tratadas). Se rellenaron 30 macetas con cada sustrato y se regaron con agua del grifo. Se plantaron 10 plantas de cada tipo en cada uno de los tratamientos, y se añadió agua del grifo en las cubetas de cada tratamiento. Para poder transplantar, se limpió el sustrato que tenían previamente las plantas en la raíz para evitar así diferencias de concentración. Finalmente, se dejaron crecer en invernadero durante un mes.

Pasado un mes, se midieron el número de flores, los pesos frescos y secos de cada planta. Para ello, con ayuda de una manguera, se eliminaron los restos de sustrato que pudiese tener cada planta en la raíz. Posteriormente, se secó cada planta para eliminar el agua que pudiese quedar adherida y se determinó el peso fresco. A continuación, se introdujeron individualmente en papel de filtro y se secaron en una estufa a 65°C. Finalmente, se midió el peso seco de cada planta.

3.7 Análisis estadístico

Para analizar los datos extraídos en los experimentos, se empleó el software

estadístico R. Se analizó la normalidad de cada muestra para seleccionar el análisis más adecuado. Para aquellas en que se cumplió la hipótesis de normalidad, se empleó la prueba ANOVA, mientras que para aquellas en que no se cumpliera, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. En ambos casos el nivel de significación es 0,05. Posteriormente en los casos en que existiera diferencia significativa, se empleó la prueba estadística de Bonferroni para conocer donde se hallaban las diferencias.

4 Resultados

4.1 Estudio del efecto del tratamiento con residuos de café sobre la germinación en pimiento

Los resultados del análisis de germinación tras 12 días (Figura 5) muestran una diferencia significativa entre tratamientos (P-valor arrojado por el ANOVA < 0,05). La prueba de Bonferroni indica que hay diferencia significativa entre el tratamiento control y el de borras de café descafeinado, mientras que el tratamiento con borras con cafeína no se diferencia de ninguno de los otros dos.

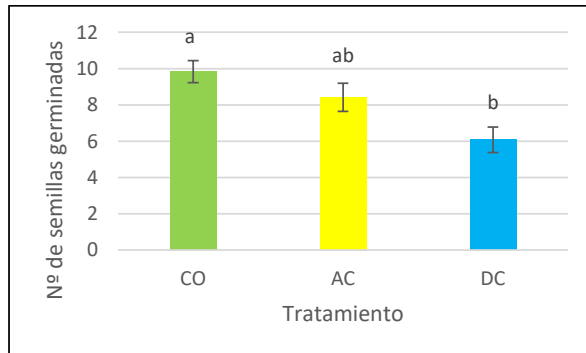


Figura 5: Efecto de las borras sobre la germinación. Los datos son la media \pm error estándar (n=12). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$). CO, control; AC, borras de café con cafeína; DC, borras de café descafeinado.

En relación al tamaño alcanzado por las plantas en los diferentes tratamientos, se pudo observar una clara diferencia entre tratamientos a simple vista (Fig. 6). Esta misma diferencia fue posteriormente apoyada por la prueba de Kruskal-Wallis (P-valor < 0,05), concluyendo que existen diferencias significativas. El resultado obtenido por Bonferroni muestra diferencias significativas entre el tratamiento control y los dos

tratamientos con borras, si bien no entre estos dos últimos (Figura 6).

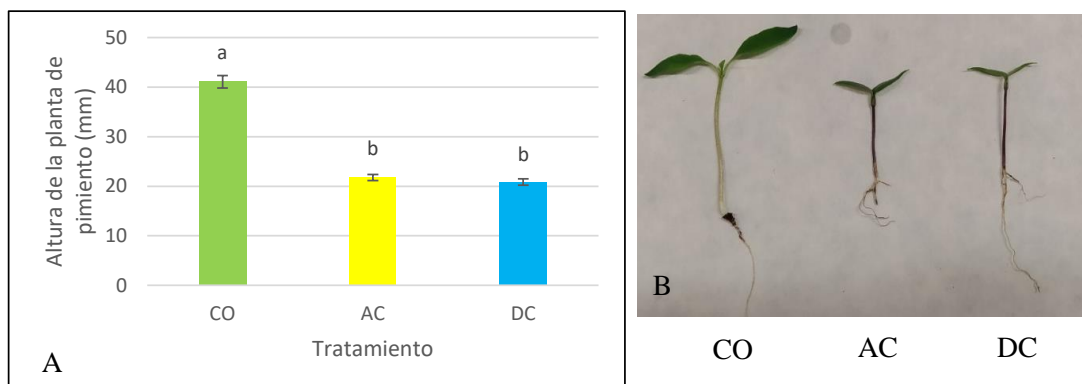


Figura 6: Efecto de las borras de café sobre la altura de las plantas de pimientero. CO, control; AC, borras de café con cafeína; DC, borras de café sin cafeína. A: Los datos son la media \pm error estándar ($n=40$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$). B: Plantas representativas de cada tratamiento.

4.2 Estudio del efecto de tratamientos con residuos de café en la resistencia del pimientero a *Botrytis cinerea*

Al analizar el área final (tras 96 horas) de las lesiones causadas por *Botrytis cinerea* en los diferentes tratamientos (Figura 7), la prueba de Kruskal-Wallis concluye que existen diferencias significativas entre estos ($P\text{-valor}<0,05$). La prueba Bonferroni determina que existe una diferencia significativa entre el tratamiento control y el tratamiento con borras de descafeinado. El tratamiento con borras con cafeína no se diferencia de los otros dos.

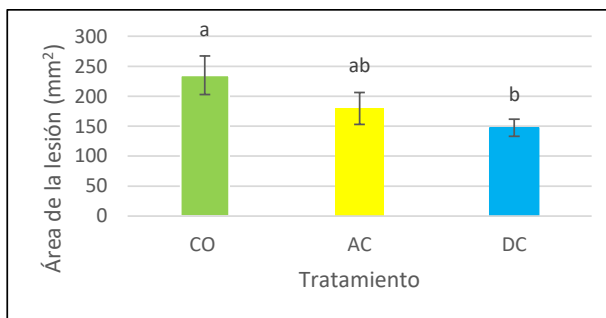


Figura 7: Efecto de los tratamientos con borras sobre la lesión causada por *Botrytis* en los diferentes tratamientos. Los datos son la media \pm error estándar ($n=40/44$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$). CO, control; AC, borras de café con cafeína; DC, borras de café descafeinado.

4.3 Estudio del efecto de tratamientos con residuos de café sobre el crecimiento de pimiento, tomate y lechuga

El peso fresco difiere de la misma forma en todas las especies estudiadas. En todos los casos el resultado del ANOVA sugiere una diferencia significativa entre tratamientos (P -valor $<0,05$). El posterior análisis con la prueba de Bonferroni destaca que existe una diferencia significativa entre el control y los tratamientos con borras de café, mientras que no existe entre los tratamientos con borras (Figura 8).

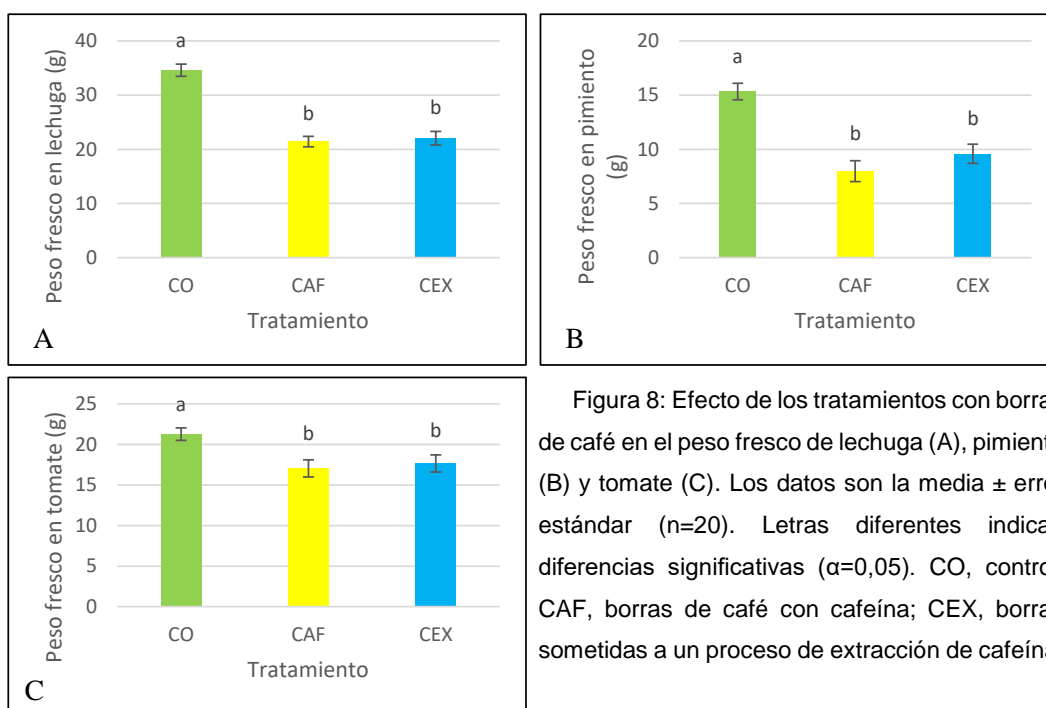


Figura 8: Efecto de los tratamientos con borras de café en el peso fresco de lechuga (A), pimiento (B) y tomate (C). Los datos son la media \pm error estándar ($n=20$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$). CO, control; CAF, borras de café con cafeína; CEX, borras sometidas a un proceso de extracción de cafeína.

En el caso del peso seco (Figura 9), no obtenemos los mismos resultados con todas las especies. En todas ellas la prueba ANOVA aporta pruebas de la existencia de diferencias significativas (P -valor $<0,05$), si bien el posterior análisis con Bonferroni difiere entre especies. Por un lado, en el caso de la lechuga y el pimiento, Bonferroni determina una diferencia significativa entre el tratamiento control y los tratamientos con borras de café. En el caso del tomate, la prueba diferencia el control y el tratamiento con borras de café con cafeína, mientras que el tratamiento con borras sometidas a extracción no se diferencia de ninguno.

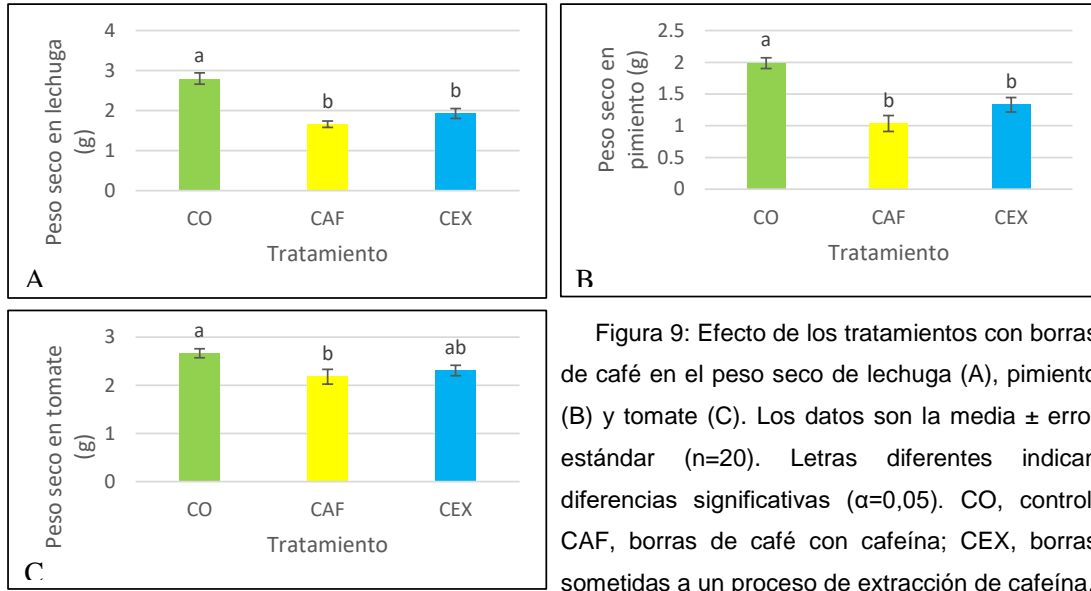


Figura 9: Efecto de los tratamientos con borras de café en el peso seco de lechuga (A), pimiento (B) y tomate (C). Los datos son la media \pm error estándar ($n=20$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$). CO, control; CAF, borras de café con cafeína; CEX, borras sometidas a un proceso de extracción de cafeína.

Al analizar el contenido hídrico relativo (Figura 10), Kruskal-Wallis determina que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P\text{-valor}>0,05$) en el caso de las plantas de lechuga y pimiento. Sin embargo, si existe diferencia significativa en el caso del tomate. Pesar de esto, al aplicar Bonferroni observamos que los dos tratamientos más diferenciados (CO y CAF) están cerca de ser significativos, si bien no llegan a serlo. Sin embargo, tanto en el caso del pimiento como el del tomate existe una diferencia significativa al 90%, diferenciando significativamente los tratamientos control y con borras sometidas a un proceso de extracción de cafeína.

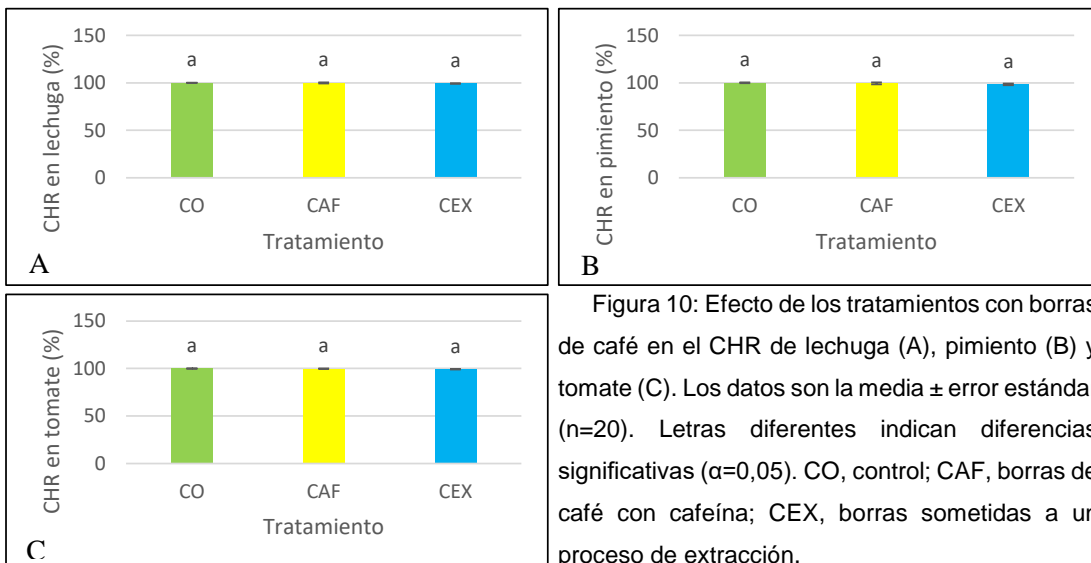


Figura 10: Efecto de los tratamientos con borras de café en el CHR de lechuga (A), pimiento (B) y tomate (C). Los datos son la media \pm error estándar ($n=20$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$). CO, control; CAF, borras de café con cafeína; CEX, borras sometidas a un proceso de extracción.

Al determinar el peso de las plantas de pimienta, se observó que algunas presentaban necrosis de cuello. Tras analizar el número de plantas que lo sufrían en cada tratamiento, se determinó que existían diferencias entre el control y los otros dos tratamientos gracias a la prueba chi-cuadrado de Pearson (Figura 11).

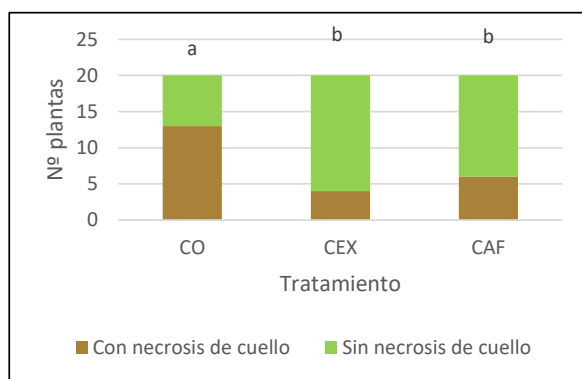


Figura 11: Efecto de los tratamientos con borras sobre la aparición de necrosis de cuello en pimienta. Los datos son la media \pm error estándar (n=20). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$). CO, control; CAF, borras de café con cafeína; CEX, borras sometidas a un proceso de extracción.

Finalmente, el análisis de los datos obtenidos de floración (Figura 12) muestra que no existe diferencia significativa en el caso del tomate (El ANOVA muestra un P-valor $>0,05$), mientras que en el caso del pimienta sí que existen diferencias significativas (El Kruskal-Wallis muestra un P-valor $<0,05$). En este último caso, el posterior análisis con Bonferroni muestra una diferencia significativa entre el tratamiento control y los tratamientos con borras de café.

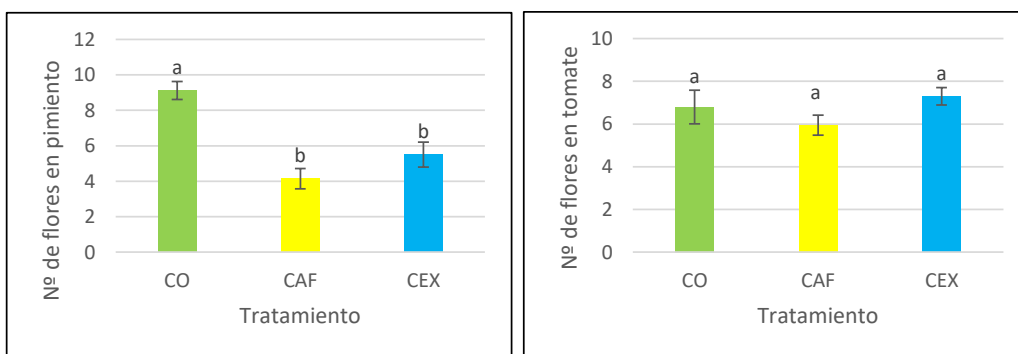


Figura 12: Efecto de las borras de café sobre la floración en pimienta (A) y tomate (B). Los datos son la media \pm error estándar (n=20). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$). CO, control; CAF, borras de café con cafeína; CEX, borras sometidas a un proceso de extracción.

5 Discusión

El crecimiento de la producción de café es continuo. En el año 2019 se produjeron 2.655.687 toneladas de café más que en 2001, lo que supuso un aumento del 36% (FAOSTAT, s.f.). Esto implica un aumento proporcional de los residuos generados. Diversos estudios analizan la posibilidad del uso de borras de café en el ámbito agrícola, bien mezclado con otras sustancias (Ciesielczuk et al., 2018; Ciesielczuk et al., 2019) o directamente aplicado sobre el sustrato (Cruz et al., 2015).

Las características de las borras fueron estudiadas por Ballesteros et al. (2014). Observaron niveles altos de polisacáridos e intermediarios en la síntesis de lignina como el ácido cafeico, clorogénico y p-cumárico. En relación al contenido en cenizas, este es del 1,3% en peso y presenta una gran diversidad de minerales, siendo el presente en mayor concentración el potasio, seguido del magnesio, fósforo, azufre y calcio. También presentaba elementos en menor concentración, como hierro y aluminio. Es importante destacar su alta capacidad de retención de agua, relacionada entre otras cosas con su baja porosidad, pues puede incrementar la posibilidad de encharcamiento y reducir la aireación en las raíces. Finalmente, Chrysargyris et al. (2021) estudian el pH de las borras, determinando un valor de 5,96. Esto es imprescindible para conocer cómo alterará la disponibilidad de nutrientes en el suelo.

En el primer experimento, se observa un menor porcentaje de germinación en los tratamientos con borras, siendo el tratamiento con arábica descafeinado aquel que alcanza menores valores. Estos resultados sugieren que a estas concentraciones (20% en volumen) se produce una inhibición de la germinación. Empleando diferentes tratamientos basados principalmente en borras de café, Ciesielczuk et al. (2018) también observan inhibición de la germinación en otras especies (*Synapis alba* L., *Triticum sp.* L., *Cucumis sativus* L. y *Lepidium sativum* L.). Sin embargo, Chrysargyris et al. (2021) afirman que puede producir un aumento de la germinación a menores concentraciones (2,5%-5%) en el género *Brassica*, y que la introducción de perlita en los diferentes tratamientos podría reducir la toxicidad de las borras y aumentar la porosidad del sustrato. Las diferencias encontradas en el crecimiento de las plantas parecen mostrar reducción del crecimiento en los tratamientos con borras de café a estas concentraciones, tanto con cafeína como descafeinado. A concentraciones de 10% en volumen (menores que las empleadas aquí), Chrysargyris et al. (2021)

también observan una reducción de altura en plantas del género *Brassica*. La reducción del crecimiento podría deberse a la presencia de algún compuesto inhibitorio o a la menor porosidad, que dificultaría la entrada de agua en la planta y la aireación de las raíces.

Las grandes diferencias observadas en el primer experimento entre el control y los otros tratamientos motivó la reducción drástica de las concentraciones de borras en el segundo experimento. En este, al analizar el área final de la herida causada por el patógeno *Botrytis cinerea*, se observaron diferencias significativas, produciendo el tratamiento con descafeinado heridas de menor tamaño que en el caso del control, y situándose el tratamiento con cafeína en una situación intermedia. Dados estos resultados, es posible que exista algún compuesto en las borras que produzca inducción de resistencia en las plantas a estas concentraciones (20g de borras en 1 litro de sustrato final). Yin et al. (2008) destacan que la cafeína podría ser un inductor de resistencia frente a un amplio rango de estreses bióticos. Posteriormente, Yin et al. (2011) sugieren que la cafeína puede inducir la resistencia en crisantemo a *Botrytis cinerea*, aumentando los niveles de ácido salicílico y aumentando la expresión del gen PR-2 en hojas maduras.

En el último experimento, se emplearon las concentraciones más bajas de borras de los tres experimentos, y se pasó de usar borras de café descafeinado a borras de café con cafeína sometidas a un proceso de extracción. En los experimentos anteriores, la principal diferencia era la concentración de cafeína, mientras que en este la diferencia radicará en una serie de compuestos eliminados conjuntamente con la cafeína en el proceso de extracción.

El análisis de los datos de peso fresco muestra una clara diferencia entre el tratamiento control y los tratamientos con borras de café, viéndose reducido el peso fresco en todas las especies al aplicarse borras de cualquiera de los tipos. En el caso de plantas del género *Brassica*, Chrysargyris et al. (2021) también aprecian una reducción del peso fresco (aunque a mayores concentraciones). Para conocer si esto se debe al contenido hídrico o al crecimiento, analizamos los resultados de peso seco y de contenido hídrico relativo. Al analizar el peso seco, los análisis arrojan resultados casi idénticos, exceptuando el caso del tomate, en que existe diferencia significativa entre el control y el tratamiento con extracción (el tratamiento sin extracción se sitúa

en un punto intermedio). Sin embargo, en el caso del contenido hídrico relativo, no existe una diferencia significativa entre tratamientos al 95%. Deducimos que los tratamientos con borras a estas concentraciones (10g de borras cada litro de sustrato comercial) disminuyen ligeramente el crecimiento en estas tres especies (*Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* y *Lactuca sativa*). Esto no tiene por qué ser algo negativo, pues Cruz et al. (2015) estudian el efecto de las borras en lechuga y concluyen que este residuo aumenta la concentración de pigmentos fotosintéticos, minerales y antioxidantes. Podría ser que una reducción del tamaño sea debida a una mayor inversión en estos aspectos, o incluso, como fue comentado anteriormente, en la defensa de la planta. También es destacable la posibilidad de que la alta capacidad de retención de agua del sustrato disminuya la entrada de agua, lo que explicaría las diferencias significativas a un 0,10 de significación en el estudio del contenido hídrico relativo.

Especialmente destacable ha sido el análisis de la presencia de necrosis de cuello en las plantas de pimiento, el cual demuestra el posible efecto positivo de los tratamientos con borras sobre las plantas de pimiento. Es necesario estudiar el posible causante de dicha afección (presumiblemente, un patógeno). Según se afirma en Wojciech et al. (2015), la cafeína afecta a la síntesis de ADN, ARN y proteínas en diversas bacterias patógenas de plantas, por lo que podría deberse a una actuación directa sobre el patógeno o bien, como ha sido comentado anteriormente, inducción de un aumento de la resistencia en la planta.

Los resultados del análisis de la floración muestran que no existe diferencia significativa entre tratamientos en el caso del tomate a esta concentración, si bien sí en el caso del pimiento, observándose una reducción de la floración. Podría ser que, al igual que un menor crecimiento, sea la consecuencia de un mayor gasto energético en mecanismos defensivos de la planta en detrimento de otros aspectos del desarrollo.

6. Conclusiones

1.-Los tratamientos con borras de café redujeron la germinación y crecimiento de *Capsicum annuum* en condiciones controladas.

2.- El tratamiento con borras de café descafeinado protegieron al pimiento frente a la infección por *Botrytis cinerea* en *Capsicum annuum*. Los efectos de las borras de café con cafeína no fueron tan claros.

3.-Las borras de café a las concentraciones empleadas producen un efecto negativo sobre el crecimiento de *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* y *Lactuca sativa*.

6. Conclusións

1.-Os tratamentos con borras de café reducion a xerminación e crecemento de *Capsicum annuum* en condiciones controladas.

2.- O tratamento con borras de café descafeinado protexeron ao pemento fronte á infección por *Botrytis cinerea* en *Capsicum annuum*. Os efectos das borras de café con cafeína non foron tan claros.

3.-As borras de café ás concentracións empregadas producen un efecto negativo sobre o crecemento de *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* e *Lactuca sativa*.

6. Conclusions

1.-Treatments with spent coffee grounds reduced germination and growth on *Capsicum annuum* in controlled conditions.

2.- The treatment with decaffeinated spent coffee grounds protected pepper against *Botrytis cinerea* in *Capsicum annuum*. The effect of spent caffeinated coffee grounds were not so clear.

3.-Spent coffee grounds at used concentrations produced a negative effect on *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* and *Lactuca sativa* growth.

7. Bibliografía

- Alves, R. C., Rodríguez, F., Nunes, M. A., F. Vinha, A. F., & P. P. Oliveira, M. B. (2017). State of the art in coffee processing by-products. In C. M. Galanakis (Ed.). *Handbook of coffee processing by-products* (1.^a ed., pp.1-26). Academic Press. <https://www.elsevier.com/books/handbook-of-coffee-processing-by-products/galanakis/978-0-12-811290-8>
- Arneson, P. A., & Ordóñez, M. E. (2000). *Roya del café*. American Phytopathological Society. Recuperado 8 de junio de 2021, de <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalbasidio/pdlessons/Pages/CoffeeRustspan.aspx>
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3493-3503.
- Bytof, G., Knopp, S.-E., Schieberle, P., Teutsch, I., & Selmar, D. (2005). Influence of processing on the generation of γ -aminobutyric acid in green coffee beans. *European Food Research and Technology*, 220, 245-250.
- Capuzzo, A., Maffei, M., & Occhipinti, A. (2013). Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules*, 18, 7194-7238.
- Chrysargyris, A., Antoniou, O., Xylia, P., Petropoulos, S., & Tzortzakis, N. (2021). The use of spent coffee grounds in growing media for the production of Brassica seedlings in nurseries. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28, 24279-24290.
- Ciesielczuk, T., Rosik-Dulewska, C., Poluszyńska, J., Miłek, D., Szewczyk, A., & Sławińska, I. (2018). Acute toxicity of experimental fertilizers made of spent coffee grounds. *Waste and Biomass Valorization*, 9, 2157-2164.
- Ciesielczuk, T., Rosik-Dulewska, C., Poluszyńska, J., & Ślęzak, E. (2019). Assessment of effectiveness of organo-mineral fertilizer made of coffee spent grounds and biomass ash. *Journal of Ecological Engineering*, 20, 73-78.
- Cruz, R., Mendes, E., Torrinha, Á., Morais, S., Pereira, J. A., Baptista, P., & Casal, S. (2015). Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach. *Food Research International*, 73, 190-196.
- de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Magalhães Júnior, A. I., Vásquez, Z. S., Medeiros, A. B. P., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2019). Exploring

- the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans—
A review. *Food Chemistry*, 272, 441-452.
- Dutta, S., Patel, D., Ganguly, K., & Lim, K.-T. (2021). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from coffee grounds for tissue engineering. *Materials Letters*, 287, 129311.
- FAOSTAT. (s. f.). *Data: Crops*. Recuperado 19 de abril de 2021, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Farah, A., de Paulis, T., Perrone, D., Trugo, L., & Martin, P. R. (2006). Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 374-381.
- Gammoudi, N., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2021). Potential use of spent coffee grounds and spent tea leaves extracts in priming treatment to promote in vitro early growth of salt-and drought-stressed seedlings of *Capsicum annuum* L. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 3341-3353.
- Garcia, C. V, & Kim, Y.-T. (2021). Spent coffee grounds and coffee silverskin as potential materials for packaging: A review. *Journal of Polymers and the Environment*. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02067-9>
- Gummadi, S. N., Bhavya, B., & Ashok, N. (2012). Physiology, biochemistry and possible applications of microbial caffeine degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 545-554.
- International Coffee Organization. (s. f. a). *Aspectos botánicos*. Recuperado 8 de junio de 2021, de https://www.ico.org/es/botanical_c.asp
- International Coffee Organization. (s. f. b). *Historia del café*. Recuperado 19 de abril de 2021, de https://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp
- International Coffee Organisation. (2020). *ICO composite and group indicator prices*. <https://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/3c-indicator-prices.pdf>
- International Coffee Organisation. (2021). *Coffee Market Report February 2021*. <https://www.ico.org/documents/cy2020-21/cmr-0221-e.pdf>
- Kim, Y.-S., & Sano, H. (2008). Pathogen resistance of transgenic tobacco plants producing caffeine. *Phytochemistry*, 69, 882-888.
- Kim, Y.-S., Lim, S., Yoda, H., Choi, Y.-E., & Sano, H. (2011). Simultaneous activation of salicylate production and fungal resistance in transgenic Chrysanthemum producing caffeine. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 409-412.
- Mekonen, S., Ambelu, A., & Spanoghe, P. (2015). Effect of household coffee

- processing on pesticide residues as a means of ensuring consumers' safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 8568-8573.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 661-672.
- Petrosyan, H., Vanyan, L., Mirzoyan, S., Trchounian, A., & Trchounian, K. (2020). Roasted coffee wastes as a substrate for *Escherichia coli* to grow and produce hydrogen. *FEMS microbiology letters*, 367, 1-7.
- Ramalakshmi, K., & Raghavan, B. (1999). Caffeine in coffee: Its removal. Why and how? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 441-456.
- Saberian, M., Li, J., Donnoli, A., Bonderenko, E., Oliva, P., Gill, B., Lockrey, S., & Siddique, R. (2021). Recycling of spent coffee grounds in construction materials: A review. *Journal of Cleaner Production*, 289, 125837.
- Summers, R. M., Mohanty, S. K., Gopishetty, S., & Subramanian, M. (2015). Genetic characterization of caffeine degradation by bacteria and its potential applications. *Microbial Biotechnology*, 8, 369-378.
- Velmourougane, K., Bhat, R., Gopinandhan, T., & Panneerselvam, P. (2011). Impact of delay in processing on mold development, ochratoxin-A and cup quality in arabica and robusta coffee. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1809–1816.
- Sledz, W., Los, E., Paczek, A., Rischka, J., Motyka, A., Zoledowska, S., Piosik, J., Lojkowska, E. (2015) Antibacterial activity of caffeine against plant pathogenic bacteria. *Acta Biochimica Polonica*, 62, 605–612
- Xin Jiat, L., Ong, H. C., Gao, W., Ok, Y. S., Chen, W.-H., Goh, B., & Chong, C. T. (2021). Solid biofuel production from spent coffee ground wastes: Process optimisation, characterisation and kinetic studies. *Fuel*, 292, 120309.