

Efecto bioestimulante de la pulpa de café en el crecimiento y desarrollo de plantas de
copoazú (*Theobroma grandiflorum*)

María Angélica Solano Gómez

Trabajo de Grado para Optar el Título de Química

Director

William Hidalgo Bucheli

Químico, Ph.D

Codirectora

Yuliany Guillín Rincón

Bióloga, M.Sc

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

A Dios,

porque cada logro de mi vida le pertenece primero a Él. Por sostenerme y guiarme a lo largo de este camino, por renovar mis fuerzas cada día y recordarme que de su mano todo es posible. Por enseñarme a confiar en sus tiempos y en sus planes, aun cuando no lograba comprenderlos, y por hacerse presente en cada persona, cada enseñanza y cada pequeño detalle que me recordó que nunca estuve sola. A Él, el dueño de mi presente y de mi futuro, sea toda la honra, la gloria y el agradecimiento.

A mi mamá, Carolina Gómez,

el mayor amor de mi vida, mi refugio y mi lugar seguro. Por ser mi ejemplo, mi consejera y la persona que siempre ha creído en mí y me ha impulsado a perseguir cada uno de mis sueños. Por cada oración que elevó por mi vida; hoy puedo ver en este logro una muestra de la fidelidad de Dios. Este título también es suyo, porque en cada paso de este camino estuvieron su amor, su entrega, sus sacrificios y su apoyo incondicional.

A mi nona, Elena Chaparro,

mi otro gran amor, quien, aunque ya no me acompaña físicamente, sé que continúa cuidándome desde el cielo. Por el amor que sembró en mi vida y por el ejemplo de fortaleza y resiliencia que siempre admiraré. Su legado permanecerá por siempre en mi corazón y me acompañará en cada uno de mis logros.

Agradecimientos

Este trabajo representa mucho más que el resultado de un proceso académico; es el reflejo del apoyo, la confianza y la generosidad de muchas personas que hicieron posible este camino. A todas ellas, mi más profundo agradecimiento.

A la Universidad Industrial de Santander por su excelencia académica y por contribuir a mi formación profesional y personal.

A mi director de tesis, el doctor William Hidalgo, por confiar en mí, por su invaluable guía, sus enseñanzas y su compromiso con mi formación como profesional. A mi codirectora, Yuliany Guillín, por su acompañamiento, sus valiosas enseñanzas y su dedicación a este trabajo. A la doctora Yuly Prada, por sus conocimientos y acompañamiento; y a Carlos Nieto, por su apoyo con el análisis estadístico y su valiosa contribución a esta investigación.

Al Grupo de Investigación CODEIM, por permitirme descubrir que la ciencia se construye no solo con conocimiento, sino también con el trabajo en equipo y las personas que hacen del camino una experiencia inolvidable. Gracias a Paula Rueda, Majo Álvarez, Danna Sarmiento, Selene Monterroza, Cristian Vargas, Karen Durán, Slendy Caicedo y Gabby Quintana por su compañerismo, sus enseñanzas y por inspirarme con su pasión por la ciencia. Los admiro profundamente y les deseo un futuro lleno de éxitos.

A mis amigos, especialmente a Juana Amézquita, Astrid Carreño, Carlos Álvarez, Sebastián González, Mafe Ortega y María Forero gracias por hacer de esta etapa una de las más bonitas de mi vida y por acompañarme incondicionalmente.

Finalmente, a mi familia, en especial a mi mamá, a mi primo Andrés y a mis tías, gracias por creer siempre en mí, por su apoyo, sus palabras de aliento y por celebrar cada logro como propio. Este sueño también les pertenece.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	15
Justificación	17
1. Objetivos	19
1.1 Objetivo General.....	19
1.2 Objetivos Específicos.....	19
2. Marco teórico	20
2.1 Marco referencial	20
2.1.1 Importancia económica, composición química y aprovechamiento productivo del copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>)	20
2.1.2 Estrés abiótico en los cultivos.....	23
2.1.3 Bioestimulantes naturales	28
2.1.4 Residuos de café como bioestimulantes	31
2.1.5 Parámetros morfológicos y fisiológicos del crecimiento en copoazú.....	40
2.1.6 Propiedades fisicoquímicas del suelo	43
2.1.7 Análisis bioquímico de compuestos funcionales en el tejido vegetal.....	45
2.2 Antecedentes	48
2.2.1 Análisis cuantitativo.....	52
3 Metodología	57
3.1 Germinación y crecimiento de plantas de copoazú.....	60
3.2 Preparación de residuos de café para su aplicación experimental	60

3.3 Tratamientos de bioestimulación con pulpa de café	61
3.4 Toma de parámetros morfológicos y fisiológicos.....	63
3.4.1 Características morfológicas	63
3.4.2 Características fisiológicas.....	65
3.5 Análisis de suelo	67
3.6 Análisis bioquímico de compuestos funcionales en tejido vegetal.....	68
3.7 Análisis estadístico.....	73
4 Resultados	75
4.1 Caracterización fisicoquímica del sustrato	75
4.2 Respuesta morfológica y acumulación de biomasa	80
4.3 Contenido de pigmentos fotosintéticos.....	89
4.4 Modulación de metabolitos primarios y secundarios.....	94
4.5 Integración de todas las variables evaluadas	101
5 Discusión de resultados.....	105
5.1 Influencia de la pulpa de café sobre las propiedades del suelo y el crecimiento vegetal	107
5.1.1 Modificación de las propiedades fisicoquímicas del suelo.....	107
5.1.2 Respuesta morfológica y asignación de biomasa.....	114
5.2 Respuesta de los pigmentos fotosintéticos a la aplicación de pulpa de café y a la alta irradiancia	117
5.3 Azúcares totales y ajustes del metabolismo primario	121
5.4 Proteínas totales y actividad metabólica vegetal	124
5.5 Fenoles y flavonoides en la respuesta antioxidante a la alta irradiancia.....	128

5.6 Integración de las respuestas bioquímicas y del crecimiento inducidas por la pulpa de café	132
6. Conclusiones	136
7. Recomendaciones	138
Referencias bibliográficas	140
Apéndices	154

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Aprovechamiento integral del fruto de copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>) y sus principales aplicaciones agroindustriales.....	23
Figura 2. Modelo bioquímico de la fotoinhibición del fotosistema II inducida por desacoplamiento redox.....	26
Figura 3. Modelo de fotodaño y reparación del fotosistema II (PSII) bajo estrés lumínico	27
Figura 4. Papel de los bioestimulantes en la mitigación de los efectos del estrés abiótico en las plantas	30
Figura 5. Estructura anatómica del fruto del cafeto y origen de sus principales subproductos	32
Figura 6. Función antioxidante de los polifenoles frente a las especies reactivas de oxígeno en células vegetales.....	36
Figura 7. Participación de los compuestos fenólicos en la respuesta de las plantas al estrés abiótico.....	38
Figura 8. Análisis cuantitativo de la investigación sobre subproductos del café y sus aplicaciones agrícolas	53
Figura 9. Flujograma del procedimiento metodológico experimental	57
Figura 10. Distribución espacial de las unidades experimentales por tratamiento	59

Figura 11. Ubicación de las mediciones morfológicas realizadas en plántulas de copoazú	64
Figura 12. Mapa de calor de las variables fisicoquímicas del suelo normalizadas respecto al control bajo condiciones de luz solar directa y bajo sombra al 65%	77
Figura 13. Comportamiento de las variables de biomasa en plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café.	80
Figura 14. Mapa de calor de los cambios relativos de las variables morfológicas y de biomasa en plántulas de copoazú	83
Figura 15. Mapa de calor de variables morfológicas en respuesta a la aplicación de pulpa de café bajo luz solar directa y bajo sombra al 65%	86
Figura 16. Contenido de Clorofilas y Carotenoides en hojas de copoazú tratadas con pulpa de café	89
Figura 17. Mapa de calor de los cambios relativos de clorofilas y carotenoides	92
Figura 18. Concentración de azúcares totales en hojas y raíces de copoazú tratadas con pulpa de café	95
Figura 19. Concentración de proteínas totales en hojas y raíces de copoazú tratadas con pulpa de café	97
Figura 20. Concentración de y Fenoles y Flavonoides en hojas y raíces de copoazú tratadas con pulpa de café	98
Figura 21. Mapa de calor de la respuesta conjunta de metabolitos primarios y secundarios en plantas de copoazú tratadas con pulpa de café.....	101
Figura 22. Red de correlaciones entre variables morfológicas, pigmentarias y bioquímicas de plantas de copoazú basada en el coeficiente de Spearman y el grado de centralidad.....	103

Lista de Tablas**Pág.**

Tabla 1. Distribución de tratamientos y unidades experimentales del estudio	
.....	59

Lista de Apéndices**Pág.**

Apéndice 1. Hojas de referencia utilizadas para la determinación de la constante k empleada en el cálculo del área foliar de plántulas de copoazú.....	154
Apéndice 2. Determinación de la constante k para el cálculo del área foliar mediante ImageJ	154
Apéndice 3. Datos utilizados para la construcción de la curva de calibración de azúcares totales empleando glucosa como estándar de referencia.....	155
Apéndice 4. Curva de calibración de glucosa utilizada para la determinación de azúcares totales en tejidos vegetales de copoazú	156
Apéndice 5. Datos utilizados para la construcción de la curva de calibración de proteínas totales empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de referencia	157
Apéndice 6. Curva de calibración de BSA utilizada para la determinación de proteínas totales en tejidos vegetales de copoazú.....	158
Apéndice 7. Datos utilizados para la construcción de la curva de calibración de fenoles empleando ácido gálico como estándar de referencia.....	158
Apéndice 8. Curva de calibración de ácido gálico utilizada para la determinación de fenoles totales en tejidos vegetales de copoazú.....	159
Apéndice 9. Datos utilizados para la construcción de la curva de calibración de flavonoides empleando catequina como estándar de referencia.....	160
Apéndice 10. Curva de calibración de catequina utilizada para la determinación de flavonoides totales en tejidos vegetales de copoazú.....	160

Apéndice 11. Contenido de clorofilas y carotenoides en plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra.....	161
Apéndice 12. Contenido de carbohidratos totales en plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra	161
Apéndice 13. Contenido de proteínas totales en hojas y raíces de plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra	162
Apéndice 14. Contenido de fenoles totales en hojas y raíces de plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra.....	162
Apéndice 15. Contenido de flavonoides totales en hojas y raíces de plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra	163
Apéndice 16. Propiedades fisicoquímicas del sustrato al final del ciclo experimental bajo diferentes dosis de pulpa de café	164
Apéndice 17. Análisis de componentes principales (PCA) de las variables morfológicas evaluadas bajo condición de luz solar directa.....	165
Apéndice 18. Análisis de componentes principales (PCA) de las variables morfológicas evaluadas bajo condición de sombra al 70%	166
Apéndice 19. Análisis de componentes principales (PCA) del contenido de Clorofilas y Carotenoides evaluadas bajo condición de luz solar directa.....	167
Apéndice 20. Análisis de componentes principales (PCA) del contenido de Clorofilas y Carotenoides evaluadas bajo condición de sombra al 70%	168
Apéndice 21. Tablas ANOVA con significancia de variables morfológicas y de biomasa	169

Apéndice 22. Tablas ANOVA con significancia de clorofilas y carotenoides	170
Apéndice 23. Tablas ANOVA con significancia de Carbohidratos totales	171
Apéndice 24. Tablas ANOVA con significancia de Proteínas totales	171
Apéndice 25. Tablas ANOVA con significancia de Flavonoides	172
Apéndice 26. Tablas ANOVA con significancia de Fenoles	172
Apéndice 27. Registro fotográfico en vista frontal de las plántulas de copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>) previo a la cosecha destructiva, bajo condiciones de luz y sombra	174
Apéndice 28. Registro fotográfico en vista superior de las plántulas de copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>) previo a la cosecha destructiva, bajo condiciones de luz y sombra	175
Apéndice 29. Registro fotográfico de las plántulas de copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>) después de la cosecha destructiva y el lavado del sistema radical, bajo condiciones de luz y sombra.....	176

Resumen

Título: Efecto bioestimulante de la pulpa de café en el crecimiento y desarrollo de plantas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*)*

Autor: María Angélica Solano Gómez**

Palabras Clave: Alta irradiancia, Bioestimulación vegetal, Copoazú (*Theobroma grandiflorum*), Metabolismo antioxidante, Propiedades fisicoquímicas del suelo, Pulpa de café, Residuos agroindustriales, Sistema suelo-planta.

Descripción: El cambio climático y la necesidad de implementar prácticas agrícolas sostenibles han impulsado la búsqueda de alternativas que mejoren la resiliencia de los cultivos frente a condiciones ambientales adversas. En este contexto, la valorización de residuos agroindustriales representa una oportunidad para desarrollar insumos con potencial bioestimulante. Entre ellos, la pulpa de café destaca por su contenido de nutrientes y compuestos bioactivos capaces de influir tanto en las propiedades del suelo como en el metabolismo vegetal.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la pulpa de café como bioestimulante sobre el desarrollo morfológico, fisiológico y bioquímico de plantas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) sometidas a condiciones de alta irradiancia, en comparación con plantas cultivadas bajo condiciones de invernadero.

Para ello, se empleó un diseño completamente aleatorizado con aplicaciones de 5, 10 y 20 g de pulpa de café como enmienda orgánica sólida. Se evaluaron variables de crecimiento vegetal, acumulación de biomasa, contenido de pigmentos fotosintéticos, azúcares totales, proteínas, fenoles y flavonoides, además de diferentes propiedades fisicoquímicas del suelo.

Los resultados mostraron que la pulpa de café mejoró la calidad química del suelo mediante incrementos en materia orgánica, nitrógeno, potasio y capacidad de intercambio catiónico. Estos cambios estuvieron asociados con un mayor desarrollo radicular y una mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos, azúcares y metabolitos antioxidantes. La respuesta dependió de la dosis aplicada y de la condición lumínica, observándose los efectos más favorables en plantas sometidas a alta irradiancia tratadas con 5 g de pulpa de café, lo que sugiere una mejor capacidad de adaptación fisiológica frente a esta condición.

En conclusión, la pulpa de café mostró potencial como bioestimulante natural al mejorar las propiedades químicas del suelo y favorecer la adaptación fisiológica del copoazú frente a la alta irradiancia, constituyéndose como una alternativa sostenible para el aprovechamiento de residuos agroindustriales.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: William Hidalgo Bucheli. Químico, Ph.D. Codirectora: Yuliany Guillín Rincón. Bióloga, M.Sc

Abstract

Title: Biostimulant effect of coffee pulp on the growth and development of copoazu plants (*Theobroma grandiflorum*)*

Author: María Angélica Solano Gómez**

Key Words: Antioxidant metabolites, Agro-industrial residues, Coffee pulp, Copoazu (*Theobroma grandiflorum*), High irradiance, Physicochemical soil properties, Plant biostimulation, Soil–plant system.

Description: Climate change and the need to implement sustainable agricultural practices have driven the search for alternatives that enhance crop resilience to adverse environmental conditions. In this context, the valorization of agro-industrial residues represents an opportunity to develop inputs with biostimulant potential. Among these, coffee pulp stands out due to its content of nutrients and bioactive compounds capable of influencing both soil properties and plant metabolism.

The objective of this study was to evaluate the effect of coffee pulp as a biostimulant on the morphological, physiological and biochemical development of copoazu plants (*Theobroma grandiflorum*) subjected to high irradiance conditions, compared with plants grown under greenhouse conditions. A completely randomized design was employed using 5, 10, and 20 g applications of coffee pulp as a solid organic amendment. Variables related to plant growth, biomass accumulation, root development, photosynthetic pigments, total sugars, proteins, phenols, and flavonoids were evaluated, together with different physicochemical soil properties.

The results showed that coffee pulp improved soil chemical quality through increases in organic matter, nitrogen, potassium, and cation exchange capacity. These changes were associated with enhanced root development and greater accumulation of photosynthetic pigments, sugars, and antioxidant metabolites. Plant responses depended on both the applied dose and the light regime, with the most favorable effects observed in plants exposed to high irradiance and treated with 5 g of coffee pulp, suggesting an improved physiological capacity to cope with this condition.

In conclusion, coffee pulp demonstrated potential as a natural biostimulant by improving soil chemical properties and promoting the physiological adaptation of copoazu plants under high irradiance conditions, constituting a sustainable alternative for the valorization of agro-industrial residues.

* Degree Work

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: William Hidalgo Bucheli. Chemist, Ph.D. Co-director: Yuliany Guillín Rincón. Biologist, M.Sc.

Introducción

La habilidad de las plantas para responder y adaptarse a condiciones ambientales desfavorables ha sido un aspecto fundamental para su crecimiento y supervivencia (Taiz et al., 2015). Sin embargo, durante las últimas décadas, factores como el cambio climático, la deforestación y el uso intensivo de agroquímicos se han relacionado con procesos de degradación del suelo, alteraciones en la disponibilidad hídrica y una mayor exposición a factores de estrés ambiental. Como consecuencia, el desarrollo de los cultivos se ve afectado, con efectos sobre la productividad agrícola, la disponibilidad de alimentos y el equilibrio ecológico. (Yang et al., 2024). En Colombia, estos efectos se han reflejado en alteraciones de los ciclos de producción y periodos de sequía más frecuentes, que en consecuencia reflejan la necesidad de adoptar estrategias sostenibles para incrementar la resiliencia de los sistemas agrícolas (Yang et al., 2024; Rodríguez et al., 2021).

En respuesta a esta problemática, diferentes investigaciones han explorado alternativas orientadas a mejorar la adaptación de los cultivos mediante la utilización de insumos naturales. Entre estas estrategias, la bioestimulación vegetal ha despertado un interés creciente por su capacidad para favorecer procesos fisiológicos y metabólicos relacionados con el crecimiento y la tolerancia al estrés. Diversos estudios han reportado que compuestos bioactivos como carbohidratos, proteínas, minerales, polifenoles y otros metabolitos pueden actuar sobre rutas metabólicas y mecanismos antioxidantes que participan en la respuesta de las plantas ante condiciones ambientales desfavorables (Rouphael & Colla., 2020; Di Sario et al., 2025).

Dentro de las principales fuentes de estos compuestos están los residuos agroindustriales, cuyo aprovechamiento representa además una oportunidad para promover prácticas de economía circular. Entre ellos, la pulpa de café corresponde al principal subproducto producido durante el

beneficio húmedo del café, proceso en el que se separan las capas externas del fruto para obtener la semilla (Alves et al., 2017). Este material conserva compuestos de interés químico, tales como polifenoles, cafeína, ácidos orgánicos y minerales, los cuales han sido asociados con efectos biológicos relevantes tanto para las plantas como para las propiedades del suelo (Serna et al., 2018).

El aprovechamiento de la pulpa de café ha adquirido especial importancia debido al elevado volumen de residuos producido por la industria cafetera. Se ha reportado que únicamente una pequeña fracción del fruto es aprovechada comercialmente, mientras que grandes volúmenes de subproductos son producidos cada año, esta situación ha promovido el desarrollo de estrategias orientadas a su aprovechamiento y reutilización con fines agrícolas y ambientales (Serna et al., 2018). En este contexto, el uso de la pulpa de café como enmienda orgánica representa una alternativa prometedora para mejorar la fertilidad del suelo y aportar compuestos bioactivos con capacidad de modular diversos procesos fisiológicos de las plantas.

Los efectos positivos de este tipo de residuos han sido reportados en cultivos como café y tomate, en los que se observaron mejoras en el desarrollo del sistema radicular, la eficiencia fotosintética, la absorción y utilización de nutrientes, así como en la respuesta de las plantas frente al estrés oxidativo (Escobar et al., 2009; Sery et al., 2025). A pesar de los avances reportados, los estudios sobre el uso de la pulpa de café como bioestimulante en especies amazónicas aún eran limitados. Particularmente, en el caso del copoazú (*Theobroma grandiflorum*), pues, aún existían pocos estudios que evaluaran de manera integral sus efectos sobre variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas bajo condiciones de estrés ambiental.

El copoazú es una especie frutal de creciente importancia económica en la región amazónica colombiana, especialmente en departamentos como Caquetá, Putumayo y Guaviare,

donde constituye una alternativa productiva para numerosas comunidades rurales (Montero et al., 2016). A pesar de su potencial agrícola y comercial, el cultivo aún enfrenta desafíos relacionados con su manejo sostenible y con la implementación de estrategias que favorezcan su adaptación a condiciones ambientales adversas, reduciendo la dependencia de insumos químicos (Escobar et al., 2009).

Con el fin de abordar esta problemática, se desarrolló un estudio experimental bajo condiciones controladas, en el que se evaluó la aplicación de diferentes dosis de pulpa de café (0, 5, 10 y 20 g) como enmienda orgánica sólida en plantas de copoazú en condiciones de luz solar directa y bajo sombra al 65% (Birhane et al., 2014). A lo largo del experimento se monitorearon variables de crecimiento vegetal, se realizaron análisis bioquímicos en tejidos foliares y radicales y se evaluaron las propiedades fisicoquímicas del suelo, con el objetivo de analizar la respuesta integral del sistema planta-suelo frente a la aplicación de la pulpa de café.

En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de pulpa de café como bioestimulante sobre el desarrollo de plantas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) cultivadas bajo condiciones de alta irradiancia y sombra mediante un análisis integral de la respuesta del sistema planta-suelo y su relación con las propiedades fisicoquímicas del suelo.

Justificación

La presente investigación se justificó por su contribución al desarrollo de estrategias sostenibles orientadas a la valorización de residuos agroindustriales y su potencial aplicación en sistemas productivos amazónicos. En este contexto, la utilización de la pulpa de café como enmienda orgánica representa una alternativa para transformar un subproducto del beneficio del

café en un recurso de valor agronómico, favoreciendo su reincorporación a los sistemas agrícolas bajo un enfoque de economía circular y de gestión eficiente de los recursos (Serna et al., 2018; Bomfim et al., 2023).

Desde el ámbito científico, las revisiones recientes sobre bioestimulantes señalan que, aunque estos constituyen una estrategia prometedora para aumentar la resiliencia de los cultivos frente al estrés abiótico, aún existen vacíos de conocimiento relacionados con sus mecanismos de acción y con la validación de su eficacia en distintas especies vegetales y bajo diversas condiciones de cultivo (Rouphael & Colla, 2020).

En este contexto, el estudio del efecto de la pulpa de café sobre variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas del copoazú (*Theobroma grandiflorum*), junto con el análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo, aporta conocimiento sobre la interacción entre este residuo agroindustrial, la respuesta de la planta y las condiciones edáficas (Zhang et al., 2024), además de aportar evidencia científica para sustentar el desarrollo de estrategias de bioestimulación que favorezcan una producción más sostenible de esta especie de importancia económica para la Amazonia colombiana (Montero et al., 2016; Escobar et al., 2009). En este contexto, los hallazgos de este estudio podrán servir como fundamento para futuras investigaciones orientadas al desarrollo y validación de estrategias de bioestimulación basadas en residuos agroindustriales, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles para este cultivo.

A partir de estas consideraciones, se formuló la siguiente pregunta de investigación: ¿qué efecto tiene la aplicación de pulpa de café como bioestimulante en el desarrollo morfológico, fisiológico y bioquímico de las plantas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*), y cómo se correlaciona este con las condiciones del suelo?

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la pulpa de café como bioestimulante sobre el desarrollo morfológico, fisiológico y bioquímico en plantas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) sometidas a condiciones de estrés lumínico en comparación con aquellas cultivadas bajo condiciones de invernadero.

1.2 Objetivos Específicos

1. Medir los parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de copoazú tratadas con pulpa de café, bajo condiciones de estrés lumínico y de sombra.
2. Determinar las propiedades fisicoquímicas del suelo y la composición bioquímica de los tejidos vegetales de plantas de copoazú tratadas con pulpa de café, bajo condiciones de estrés lumínico y de sombra.
3. Correlacionar las variaciones en morfología, fisiología y composición química de las plantas de copoazú con las condiciones del suelo, en función de los tratamientos de bioestimulación.

2. Marco Teórico

2.1 Marco referencial

2.1.1 Importancia económica, composición química y aprovechamiento productivo del copoazú (*Theobroma grandiflorum*)

La región amazónica, reconocida por su alta biodiversidad, alberga numerosas especies vegetales de importancia ecológica, económica y social (Rosa et al., 2024). Entre ellas se destaca el copoazú (*Theobroma grandiflorum*), una especie de la familia *Malvaceae* y estrechamente relacionada con el cacao (*Theobroma cacao*) (Escobar et al., 2009). Este árbol frutal ha cobrado relevancia por su capacidad de incorporarse a sistemas agroforestales sostenibles, favoreciendo la conservación de los suelos y contribuyendo al desarrollo productivo de las comunidades amazónicas (Rodríguez et al., 2021).

El interés económico del copoazú radica en el aprovechamiento integral de su fruto. La pulpa, principal producto comercial, se utiliza en la elaboración de jugos, mermeladas, néctares, yogures, helados y otros alimentos procesados debido a sus características sensoriales y a su perfil aromático. Las semillas son utilizadas para producir *cupulate*, un sustituto del chocolate con propiedades organolépticas similares y mayor estabilidad térmica, además de servir como materia prima para la obtención de manteca destinada a las industrias cosmética y farmacéutica. Por su parte, la cáscara puede aprovecharse como biomasa o como abono orgánico, favoreciendo el uso integral del fruto y la reducción de residuos (Rosa et al., 2024; Velásquez et al., 2025).

A nivel internacional, el copoazú se ha consolidado como uno de los productos forestales no maderables con mayor potencial dentro de la bioeconomía amazónica. Se estima que el mercado global asociado a esta especie podría superar los 62 millones de dólares hacia 2030, como resultado del incremento en la demanda de alimentos funcionales, ingredientes naturales y

productos cosméticos de origen vegetal provenientes de la Amazonia (Rosa et al., 2024). Brasil es actualmente el principal productor mundial, concentrando gran parte de la producción comercial en el estado de Pará, donde en 2019 se registraron más de 4100 toneladas de fruto y alrededor de 2,6 millones de dólares en ingresos (Rosa et al., 2024).

En Colombia, el copoazú representa una alternativa para promover la diversificación de la producción agrícola y favorecer el desarrollo económico de la Amazonia. Según registros de Agronet recopilados por Velásquez et al. (2025), durante 2022 la producción nacional alcanzó aproximadamente 1125,5 toneladas en 205 hectáreas sembradas, localizadas principalmente en Caquetá, Putumayo, Amazonas y Vaupés. Particularmente, en Caquetá se reportaron 36 hectáreas sembradas y 18 hectáreas cosechadas en 2020, con una producción cercana a 72 toneladas, consolidando a este departamento como uno de los principales referentes nacionales para el cultivo de esta especie (Velásquez et al., 2021).

Desde una perspectiva química, la pulpa del copoazú presenta una marcada acidez (pH 2,6–3,8) y un perfil aromático asociado principalmente a compuestos volátiles como los ésteres. Asimismo, es rica en carbohidratos, especialmente sacarosa, que puede representar cerca del 34,6 % de la materia seca, además de contener vitamina C, pectinas y otros compuestos de interés nutricional e industrial (Rosa et al., 2024; Rodríguez & Hernández., 2025). Las semillas constituyen la fracción con mayor contenido lipídico (50–60 % del peso seco) y contienen polifenoles, flavonoides, taninos y otros metabolitos bioactivos con potencial antioxidante, además de alcaloides como teobromina y cafeína en concentraciones inferiores a las del cacao (Rosa et al., 2024; Velásquez et al., 2025).

La manteca de copoazú, obtenida mediante el prensado de las almendras, es uno de los productos de mayor valor agregado derivados de esta especie. Está compuesta principalmente

por ácidos oleico, esteárico, palmítico, araquídico y linoleico, composición que le confiere propiedades emolientes, elevada capacidad de retención de humedad y buena estabilidad oxidativa, favoreciendo su aplicación en formulaciones cosméticas y farmacéuticas (Rosa et al., 2024; Velásquez et al., 2025). Asimismo, se han descrito propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y antipalúdicas asociadas a sus compuestos bioactivos (Velásquez et al., 2025; Rodríguez & Hernández., 2025).

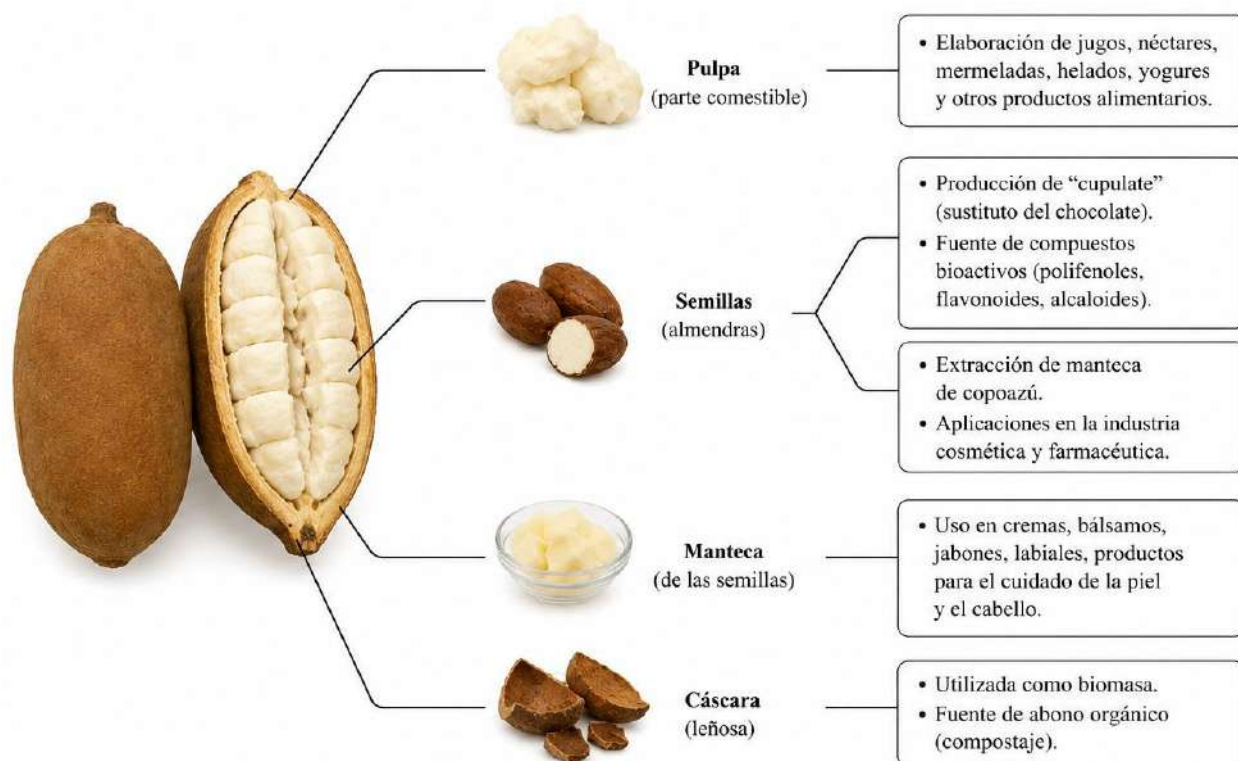
El creciente interés comercial por este subproducto se refleja en iniciativas recientes como la primera exportación de 250 kg de manteca de copoazú colombiana realizada en 2023 hacia plantas de procesamiento de la empresa Natura en Brasil. Considerando que la demanda insatisfecha supera actualmente las 16 toneladas, este producto representa una oportunidad de crecimiento para la cadena productiva amazónica (Velásquez et al., 2025).

En conjunto, las características productivas, económicas y químicas del copoazú posicionan a esta especie como un recurso estratégico para la Amazonia colombiana. Su potencial para la obtención de productos con alto valor agregado, sumado a la presencia de compuestos bioactivos de interés nutricional e industrial, sustenta el desarrollo de investigaciones dirigidas a mejorar su productividad, sostenibilidad y capacidad de adaptación frente a condiciones ambientales cambiantes.

De manera complementaria, el aprovechamiento integral del fruto de copoazú evidencia el amplio potencial agroindustrial de esta especie. Como se resume en la **Figura 1**, la pulpa, las semillas y la cáscara representan materias primas con aplicaciones específicas en las industrias alimentaria, cosmética y agrícola, lo que pone de manifiesto su potencial para el desarrollo de estrategias orientadas a su aprovechamiento sostenible y a la generación de valor agregado.

Figura 1.

*Aprovechamiento integral del fruto de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) y sus principales aplicaciones agroindustriales*



Nota. Se presentan las principales estructuras del fruto de copoazú (pulpa, semillas y cáscara) y algunos de sus usos más representativos en las industrias alimentaria, cosmética y agrícola. La información fue sintetizada a partir de Escobar et al. (2009) y Rosa et al. (2024).

2.1.2 Estrés abiótico en los cultivos

El estrés abiótico agrupa diversos factores ambientales que limitan el crecimiento y alteran el metabolismo de las plantas, entre ellos la salinidad, la sequía, las temperaturas extremas y la deficiencia de nutrientes esenciales. Estos factores desencadenan alteraciones a nivel tisular, celular y molecular, que se traducen en patrones de crecimiento anormales, disminución de la eficiencia fotosintética y reducción de la capacidad reproductiva. Por ejemplo,

la escasez de agua, que induce el cierre estomático, limitando la entrada de CO₂ y afectando la regulación térmica de las hojas. De manera similar, el exceso de sales altera la homeostasis iónica, favoreciendo la acumulación de iones tóxicos y los desequilibrios osmóticos, lo que reduce la productividad y la calidad de los cultivos (Taiz et al., 2015).

Tradicionalmente, la mitigación de estos efectos ha dependido de prácticas como el riego intensivo y el uso excesivo de fertilizantes, las cuales contribuyen a la degradación ambiental. Esta problemática resalta la necesidad de implementar enfoques agrícolas más sostenibles (Yang et al., 2024). En este sentido, los bioestimulantes se han consolidado como una alternativa con potencial para fortalecer la resiliencia de las plantas frente al estrés abiótico, mejorar la eficiencia en el uso de los recursos y disminuir el impacto ambiental asociado a los sistemas de producción agrícola (Rouphael & Colla., 2020).

2.1.2.1 Estrés lumínico y fotoinhibición. El estrés lumínico ocurre cuando la energía absorbida por los pigmentos fotosintéticos excede la capacidad del aparato fotosintético para utilizarla en los procesos de fijación de carbono. Este desequilibrio entre la captura y el consumo de energía altera el estado redox del cloroplasto y favorece la fotoinhibición, entendida como el desbalance entre la tasa de fotodaño y la capacidad de reparación del fotosistema II (PSII). Cuando la fijación fotosintética de CO₂ disminuye, también se reduce el consumo de ATP y NADPH, lo que favorece la acumulación de poder reductor y crea condiciones propicias para el desarrollo del estrés oxidativo (Takahashi & Murata., 2008).

Actualmente se reconoce que la fotoinhibición no depende únicamente de un aumento en el fotodaño, sino principalmente de la disminución en la capacidad de reparación del PSII bajo condiciones de estrés. Factores como la alta irradiancia, la salinidad, las temperaturas extremas y otros estreses ambientales inhiben la síntesis de proteínas fotosintéticas, especialmente de la

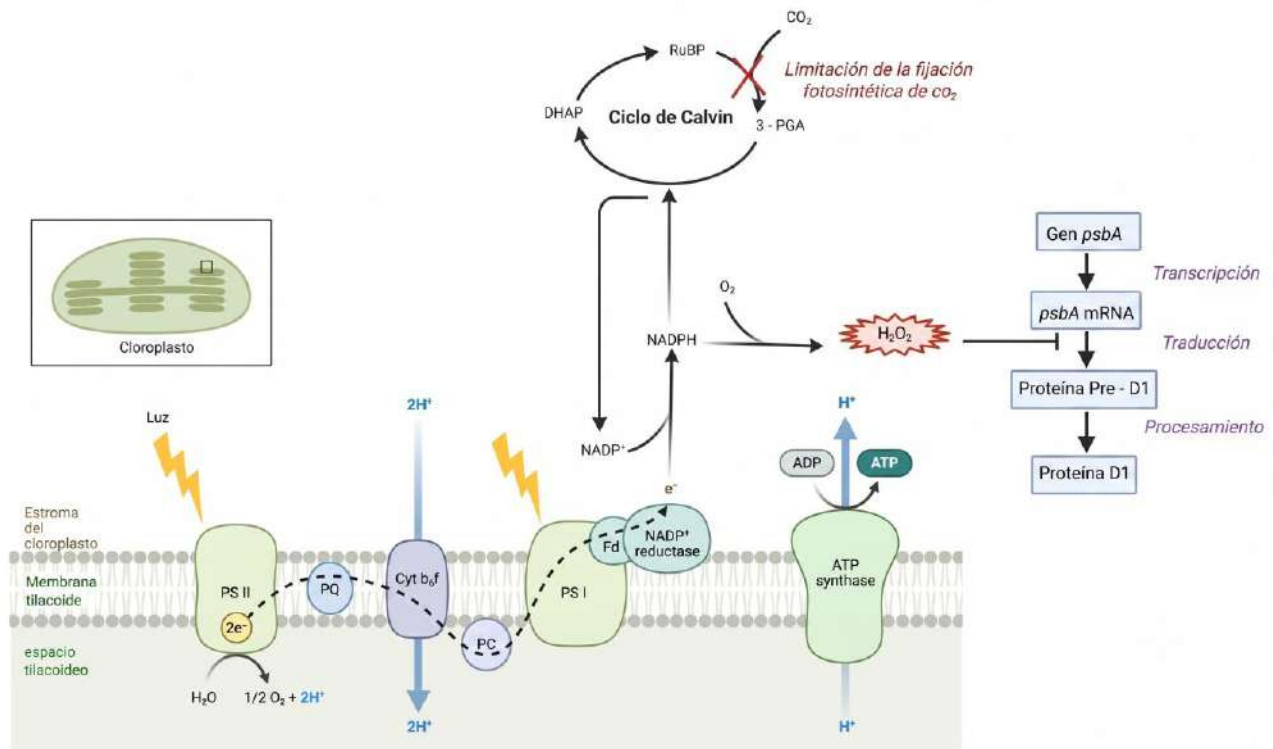
proteína D1, componente esencial del centro de reacción del PSII y responsable de mantener su funcionalidad. En consecuencia, cuando la proteína D1 dañada no puede ser reemplazada eficientemente, el fotosistema pierde progresivamente su capacidad fotosintética (Takahashi & Murata., 2008).

La reducción de la fijación de CO₂ también disminuye la disponibilidad de NADP⁺ como aceptor final de electrones en el fotosistema I (PSI), lo que favorece la transferencia de electrones al oxígeno molecular y, en consecuencia, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O₂•⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Si bien las plantas disponen de sistemas antioxidantes encargados de neutralizar estas especies, una producción excesiva de ROS puede sobrepasar su capacidad de respuesta y desencadenar estrés oxidativo (Takahashi & Murata., 2008). Este flujo metabólico y el modelo bioquímico de la fotoinhibición inducida por el desacoplamiento redox se esquematizan en la **Figura 2**.

Las ROS desempeñan un papel determinante en la fotoinhibición al interferir con la maquinaria responsable de sintetizar la proteína D1, limitando la reparación del PSII. De esta manera, el daño oxidativo compromete la renovación de este complejo fotosintético y acelera la pérdida de eficiencia fotosintética. En este contexto, se ha demostrado que el daño oxidativo asociado a la fotoinhibición afecta principalmente la síntesis proteica, en mayor medida que el incremento directo del fotodaño en el fotosistema (Takahashi & Murata., 2008; Nishiyama et al., 2011).

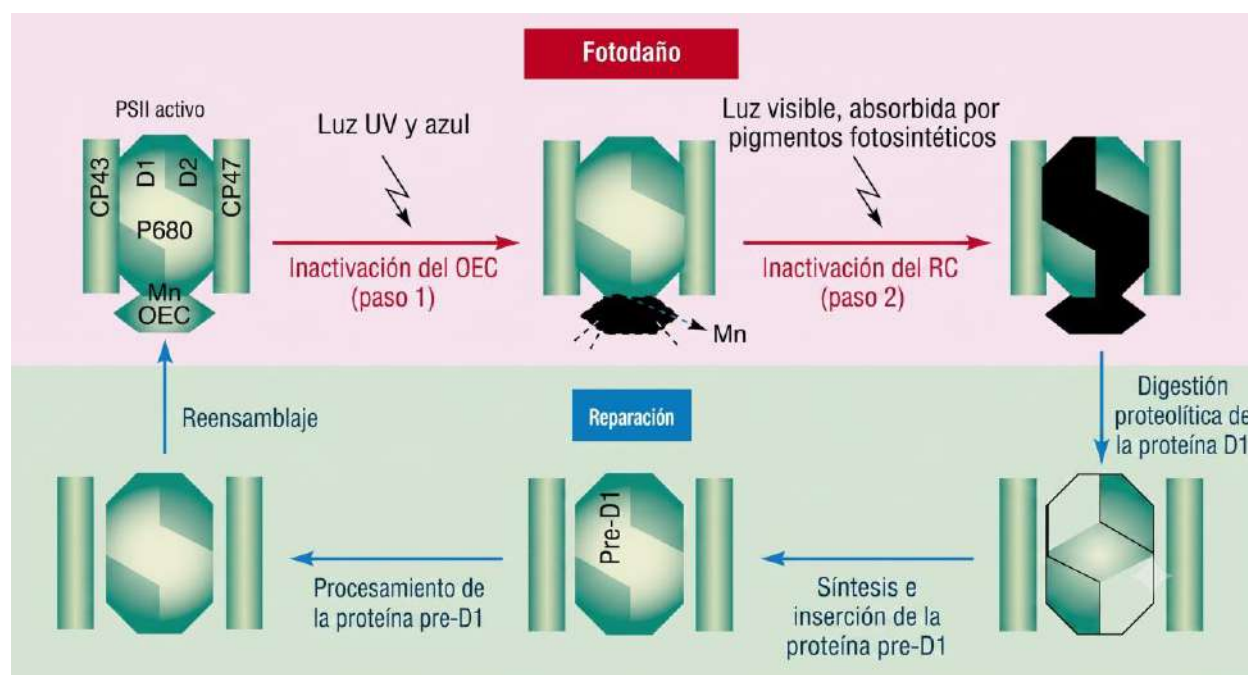
Figura 2.

Modelo bioquímico de la fotoinhibición del fotosistema II inducida por desacoplamiento redox



Nota. Representación esquemática del efecto de la limitación de la fijación de carbono en el ciclo de Calvin sobre la sobrerreducción de la cadena de transporte electrónico fotosintético, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inhibición de la síntesis de la proteína D1, necesaria para la reparación del fotosistema II (PSII). Adaptado de Takahashi & Murata (2008) para fines académicos.

En consecuencia, la fotoinhibición puede entenderse como el resultado de un desequilibrio entre el daño fotoquímico y la capacidad de reparación del PSII, en el que la acumulación de ROS y la inhibición de la síntesis de la proteína D1 desempeñan un papel central.

Figura 3.*Modelo de fotodaño y reparación del fotosistema II (PSII) bajo estrés lumínico*

Nota. Esquema que representa las etapas secuenciales de fotodaño y reparación del fotosistema II (PSII). El fotodaño inicia con la inactivación del complejo liberador de oxígeno (OEC), asociada a la alteración del clúster de manganeso, y continúa con el daño fotooxidativo del centro de reacción y de la proteína D1 tras la excitación de P680. El modelo también muestra el proceso de reparación mediante degradación y reemplazo de la proteína D1 para restablecer la funcionalidad del PSII. Adaptado de Takahashi & Murata (2008).

Las etapas secuenciales de este proceso de fotodaño y los mecanismos celulares para su reparación se detallan de forma analítica en el modelo de la **Figura 3**. El fotodaño se inicia con la alteración del complejo liberador de oxígeno (OEC), afectando la transferencia de electrones hacia el centro de reacción del PSII. Posteriormente, la excitación continua de los pigmentos fotosintéticos favorece procesos fotooxidativos que deterioran la proteína D1, principal blanco del daño lumínico. La reparación del PSII requiere la degradación de la proteína D1 dañada y su

reemplazo por una nueva copia funcional; por ello, la fotoinhibición se establece cuando la tasa de fotodaño supera la capacidad de reparación del sistema, reduciendo progresivamente la eficiencia fotosintética (Takahashi & Murata., 2008).

En este contexto, las estrategias que limitan la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y favorecen los mecanismos de protección y reparación del aparato fotosintético representan una vía para aumentar la tolerancia de las plantas al estrés lumínico. En consecuencia, los bioestimulantes de origen natural se han consolidado como una alternativa prometedora por su capacidad para regular estos procesos fisiológicos y fortalecer la adaptación de los cultivos frente a condiciones ambientales desfavorables.

2.1.3 Bioestimulantes naturales

Los bioestimulantes se definen como sustancias o microorganismos que, al aplicarse en bajas dosis, estimulan procesos naturales de las plantas, favoreciendo la absorción y la eficiencia en el uso de los nutrientes, incrementando la tolerancia al estrés abiótico y mejorando la calidad y el rendimiento de los cultivos, sin aportar nutrientes en cantidades significativas ni actuar como fertilizantes, pesticidas o sustratos (Zhang & Schmidt., 1997). A diferencia de los biofertilizantes, cuyo propósito es aportar nutrientes directamente, los bioestimulantes modulan procesos fisiológicos y metabólicos de la planta, induciendo respuestas que favorecen el crecimiento, el desarrollo y la adaptación a condiciones ambientales adversas (Di Sario et al., 2025).

De acuerdo con la normativa de la Unión Europea, los bioestimulantes se definen como productos que estimulan los procesos de nutrición vegetal independientemente de su contenido de nutrientes. En consecuencia, contribuyen a mejorar la eficiencia en el uso de los nutrientes,

fortalecer la tolerancia al estrés abiótico, optimizar la calidad de los cultivos y aumentar la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera (European Union, 2019).

Así, los bioestimulantes no actúan como una fuente directa de nutrientes, sino que optimizan su aprovechamiento al modular procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo del sistema radicular, favoreciendo una mayor capacidad de absorción y una mayor eficiencia en el uso de los recursos. Adicionalmente, estimulan mecanismos de adaptación, como el ajuste osmótico y la activación de los sistemas antioxidantes, lo que permite preservar el funcionamiento fisiológico y el rendimiento agronómico de las plantas frente a condiciones de estrés (Di Sario et al., 2025; Rouphael & Colla., 2020).

Los bioestimulantes pueden aplicarse mediante tratamiento de semillas, aspersión foliar o incorporación al suelo, y comprenden una amplia variedad de compuestos bioactivos, extractos vegetales y microorganismos. Su eficacia depende tanto del origen de la materia prima como del proceso de obtención, la formulación y las condiciones de aplicación, ya que estos factores determinan su composición y los procesos fisiológicos que pueden modular (Di Sario et al., 2025).

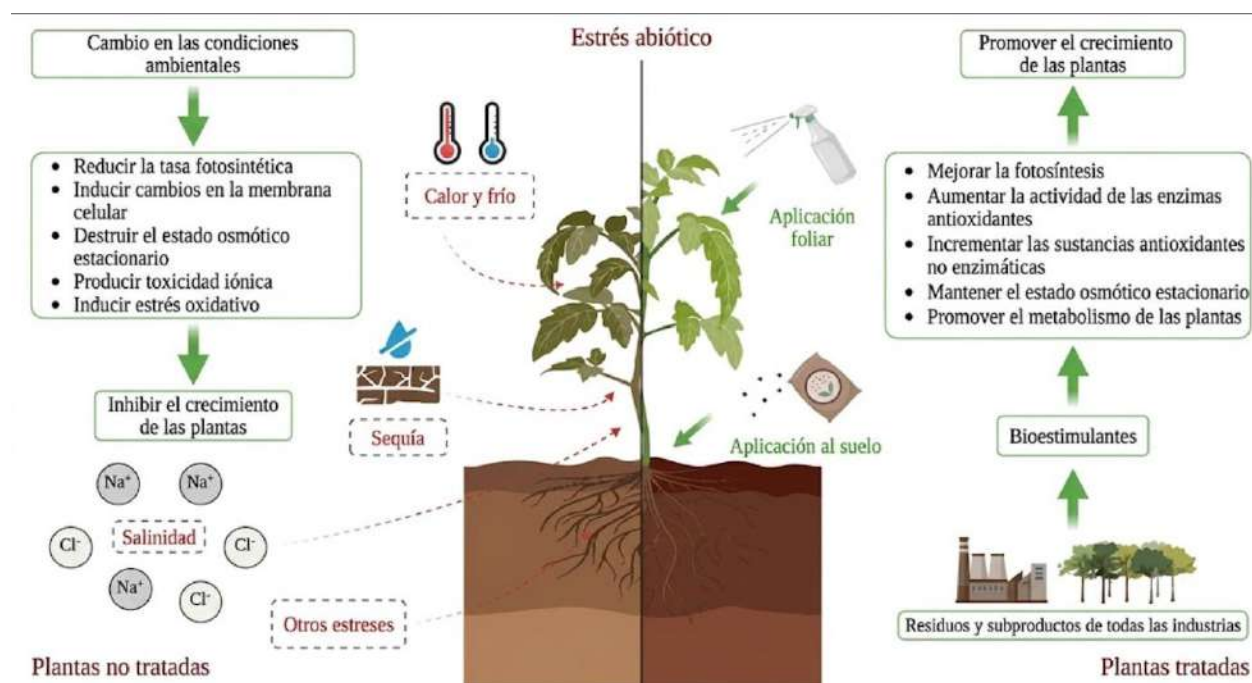
Entre ellos, los bioestimulantes de origen vegetal han adquirido especial relevancia por su capacidad para promover procesos relacionados con el desarrollo radicular, la floración, la formación de frutos y la adaptación de las plantas al estrés abiótico. A nivel fisiológico, se ha demostrado que pueden regular procesos relacionados con la nutrición mineral, el metabolismo primario y especializado, la fotosíntesis, el metabolismo oxidativo y la señalización celular, repercutiendo finalmente sobre el crecimiento y la productividad de los cultivos. Por ello, su desarrollo requiere la caracterización de los compuestos bioactivos presentes y de los cambios

metabólicos inducidos, con el fin de optimizar su formulación para diferentes especies y condiciones de cultivo (Zhang et al., 2024).

Esta dependencia de la composición también se manifiesta en los bioestimulantes obtenidos a partir de residuos y subproductos agroindustriales, especialmente aquellos de origen vegetal. En estos casos, la respuesta de las plantas está determinada por la naturaleza y la concentración de los compuestos bioactivos presentes, así como por el método de aplicación utilizado (Martínez et al., 2024). De manera general, estas interacciones se ilustran en la **Figura 4**, donde se muestra cómo la aplicación de bioestimulantes, tanto por vía foliar como al suelo, modula procesos relacionados con el equilibrio osmótico, la actividad antioxidante, la fotosíntesis y el metabolismo vegetal, favoreciendo la tolerancia al estrés y el crecimiento de las plantas bajo condiciones ambientales adversas (Martínez et al., 2024).

Figura 4.

Papel de los bioestimulantes en la mitigación de los efectos del estrés abiótico en las plantas



Nota. Representación esquemática de los efectos del estrés abiótico sobre el crecimiento de las plantas y de los mecanismos mediante los cuales los bioestimulantes contribuyen a mitigar dichos efectos. Se ilustra cómo factores como la sequía, la salinidad y las temperaturas extremas alteran procesos fisiológicos y metabólicos, mientras que la aplicación de bioestimulantes por vía foliar o al suelo favorece la fotosíntesis, la actividad de enzimas antioxidantes, el equilibrio osmótico y el metabolismo vegetal, fortaleciendo la tolerancia al estrés y promoviendo el crecimiento de las plantas. Adaptado de Zhang et al. (2024).

2.1.4 Residuos de café como bioestimulantes

El café es una de las bebidas de mayor consumo a nivel mundial, con una demanda que supera los 400 mil millones de tazas al año. Como consecuencia de la magnitud de esta cadena productiva, el aprovechamiento y la valorización de los residuos generados durante el cultivo, beneficio y procesamiento del café han adquirido un creciente interés desde las perspectivas ambiental, económica y agrícola (Mussatto et al., 2011).

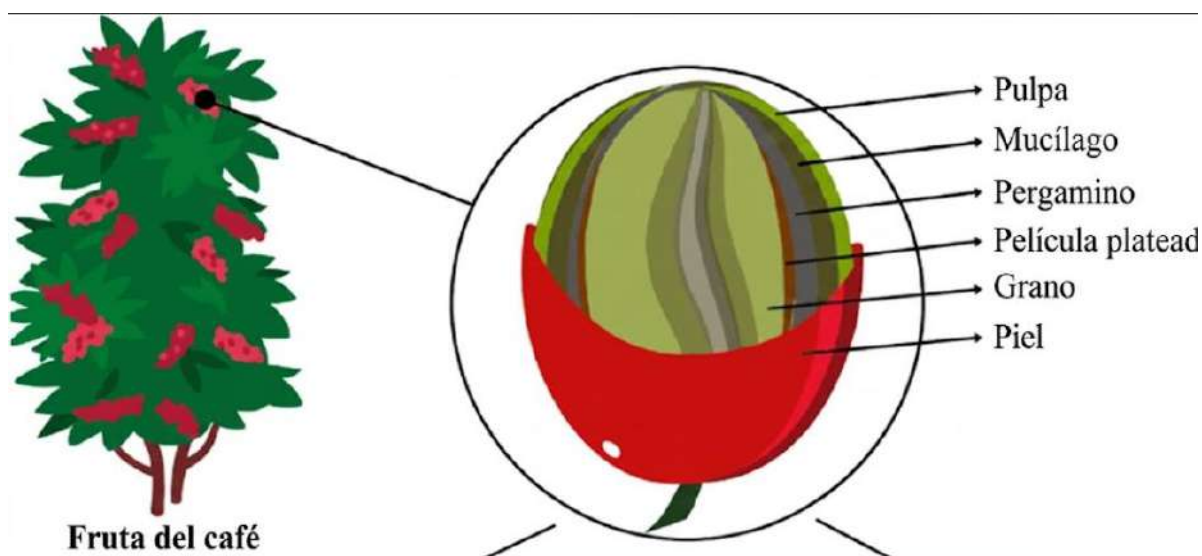
El cafeto pertenece a la familia *Rubiaceae* que incluye más de 70 especies del género *Coffea*. A pesar de esta diversidad, la producción comercial a escala mundial está dominada por *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (robusta), responsables de aproximadamente el 75 % y el 25 % del mercado, respectivamente. Mientras *C. canephora* se caracteriza por una mayor resistencia a plagas, ambas especies difieren en sus requerimientos agroecológicos y rangos altitudinales de cultivo (Mussatto et al., 2011).

La estructura anatómica detallada de la cereza del café y el origen de los residuos asociados a sus diferentes capas protectoras se ilustran en la **Figura 5**. El fruto del cafeto está constituido por dos granos rodeados por diferentes capas protectoras, entre ellas la pulpa, correspondiente al mesocarpio, la cual se obtiene principalmente durante el beneficio húmedo

mediante la separación mecánica de la cereza. Este subproducto representa cerca del 30 % del peso seco del fruto (o aproximadamente el 40 % del peso fresco), generándose alrededor de 430 g de pulpa por cada kilogramo de cerezas procesadas, lo que la convierte en el principal residuo sólido de la industria cafetera (Martínez et al., 2019).

Figura 5.

Estructura anatómica del fruto del cafeto y origen de sus principales subproductos



Nota. Esquema de la estructura anatómica del fruto (cereza) del cafeto y de las capas que lo conforman: epidermis (piel), pulpa, mucílago, pergamino, película plateada (cascarilla) y grano. La figura también muestra el origen de los principales subproductos obtenidos durante el beneficio y procesamiento del café, destacando la pulpa, el mucílago y la cascarilla por su potencial de valorización y aplicación en los sectores agrícola e industrial. Adaptado de Bomfim et al. (2023).

En términos de su composición, la pulpa contiene aproximadamente 50 % de carbohidratos, 20 % de fibra, 7–10 % de proteínas, 1,4–2,5 % de grasas y entre 0,68–1,3 % de cafeína. Asimismo, contiene una cantidad significativa de compuestos fenólicos, incluidos flavonoides y ácidos hidroxicinámicos como los ácidos clorogénico, cafeico y ferúlico,

metabolitos reconocidos por su actividad antioxidante. Aunque la presencia de cafeína y algunos polifenoles puede limitar su utilización directa como alimento animal, estas características composicionales respaldan el potencial de la pulpa como materia prima para el desarrollo de productos de alto valor agregado destinados a aplicaciones agrícolas, alimentarias e industriales. (Martínez et al., 2019).

Además de la pulpa, el procesamiento y consumo del café generan otros subproductos de interés, como la cascarilla y las borras o *spent coffee grounds* (SCG). Estas últimas contienen carbohidratos, lignina, proteínas, lípidos, minerales y compuestos fenólicos, por lo que han sido propuestas como fuentes de productos de valor agregado, enmiendas orgánicas y biofertilizantes. No obstante, su uso agrícola debe realizarse de manera adecuada, ya que un contenido elevado de cafeína puede afectar negativamente procesos como la germinación y el crecimiento vegetal, razón por la cual se recomienda emplearlas en bajas dosis o previo compostaje (Mussatto et al., 2011; Bomfim et al., 2023).

En conjunto, los diferentes subproductos del café concentran compuestos bioactivos y una elevada proporción de materia orgánica que respaldan su potencial para aplicaciones agrícolas. No obstante, la respuesta de las plantas está condicionada por el tipo de residuo, su composición química, el tratamiento previo y la dosis de aplicación, factores que influyen tanto su eficacia como en la posible aparición de respuestas fitotóxicas (Martínez et al., 2019; Bomfim et al., 2023).

Entre los subproductos derivados del beneficio del café, la pulpa ha adquirido un gran interés por su abundancia y a la diversidad de compuestos bioactivos que contiene, características que respaldan su uso como una materia prima para la elaboración de bioestimulantes y enmiendas orgánicas. Además, su aprovechamiento contribuye a la

valorización de residuos agroindustriales y promueve modelos de producción basados en los principios de la economía circular y la agricultura sostenible (Serna et al., 2018).

2.1.4.1 Impacto de los residuos de café en el suelo y el crecimiento vegetal. El aprovechamiento de los residuos del café mediante su incorporación al suelo representa una estrategia de valorización agroambiental que favorece el manejo sostenible de estos subproductos y contribuye al mejoramiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Serna et al., 2018). Su aplicación como enmiendas orgánicas o como componentes de compost aporta materia orgánica y nutrientes esenciales, especialmente nitrógeno, fósforo y potasio, mejorando la estructura del suelo, la retención de agua y la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Rodríguez 2021; Bomfim et al., 2023). Adicionalmente, su riqueza nutricional y el bajo riesgo de contaminación por metales pesados respaldan su utilización como una alternativa sostenible para el manejo de suelos agrícolas (Bomfim et al., 2023).

La respuesta de las plantas a la aplicación de residuos del café depende de su composición química, del procesamiento al que hayan sido sometidos y de la dosis utilizada. En condiciones adecuadas de aplicación, estos materiales pueden actuar como bioestimulantes, estimulando el desarrollo radicular, el crecimiento foliar y la actividad de la microbiota del suelo, con efectos positivos sobre la mineralización de la materia orgánica y la eficiencia en el aprovechamiento de nutrientes (Rodríguez, 2021). No obstante, dosis excesivas o materiales sin un tratamiento apropiado pueden inducir respuestas fitotóxicas, asociadas principalmente con el contenido de cafeína y compuestos fenólicos, capaces de afectar la germinación y el desarrollo de algunas especies vegetales (Bomfim et al., 2023).

La disposición inadecuada de la pulpa de café constituye un desafío ambiental, debido a su alta carga orgánica y a la presencia de metabolitos que pueden afectar el equilibrio biológico

de los suelos y los cuerpos de agua. Por esta razón, su utilización en la agricultura requiere tratamientos previos, como el secado, el compostaje u otras estrategias de acondicionamiento, que permitan disminuir el riesgo de fitotoxicidad y potenciar sus beneficios sobre las propiedades del suelo y el crecimiento vegetal (Martínez et al., 2019). En este contexto, la valorización de este subproducto como bioestimulante representa una estrategia alineada con los principios de la economía circular, al promover el aprovechamiento de residuos agroindustriales y favorecer sistemas de producción agrícola más sostenibles.

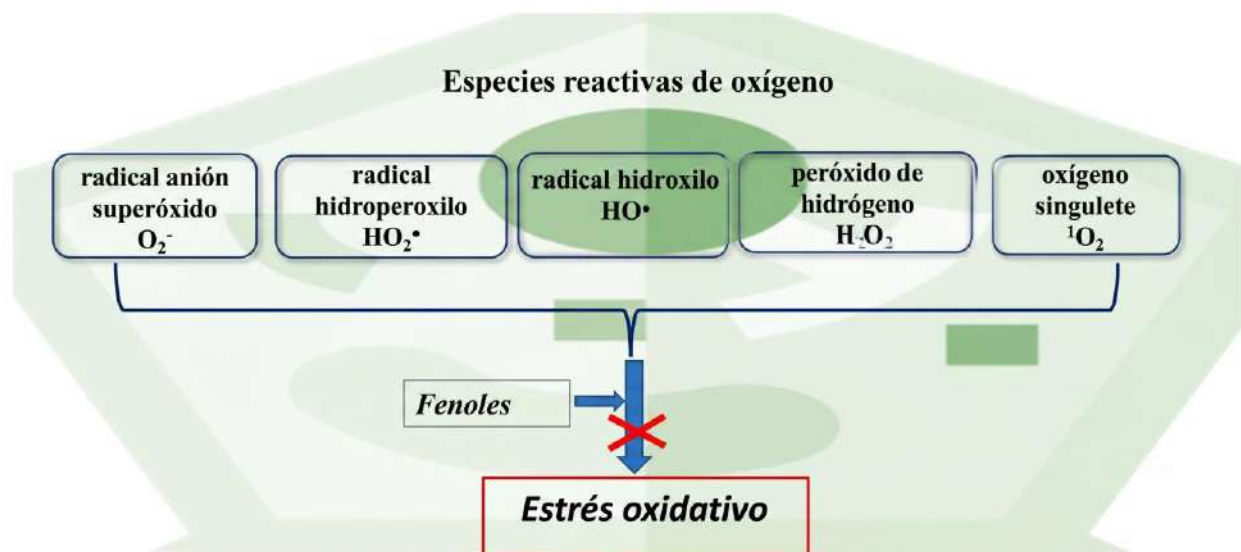
2.1.4.2 Posible efecto de los componentes de la pulpa de café en la mitigación del fotodaño. Debido a su composición química, la pulpa de café representa una fuente importante de compuestos fenólicos, flavonoides y otros metabolitos con actividad antioxidante, lo que ha impulsado su evaluación como materia prima para la obtención de bioestimulantes orientados a mejorar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico (Martínez et al., 2019; Rodríguez, 2021). Diversas investigaciones han demostrado que, en condiciones de estrés, las plantas aumentan la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos como parte de sus mecanismos de adaptación, contribuyendo al mantenimiento del equilibrio redox, la reducción del daño oxidativo y la preservación de la funcionalidad celular (Sharma et al., 2019; Ninkuu et al., 2025).

En respuesta al estrés abiótico, los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas aumentan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Si la producción de estas especies sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes para mantener la homeostasis redox, se desencadena un estado de estrés oxidativo que provoca peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño en los ácidos nucleicos, afectando la integridad del aparato fotosintético y múltiples procesos del metabolismo celular (Rao & Zheng., 2025).

El mecanismo de protección celular mediante el cual los compuestos fenólicos ejercen su función antioxidante no enzimática y neutralizan la diversidad de radicales libres se ilustra en la **Figura 6**. Desde esta perspectiva, los compuestos fenólicos constituyen un componente esencial del sistema antioxidante no enzimático de las plantas. Su capacidad para captar especies reactivas de oxígeno (ROS), quelar metales de transición e inhibir reacciones prooxidantes limita el desarrollo del estrés oxidativo y reduce el daño sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. De manera complementaria, estos metabolitos interactúan con los sistemas antioxidantes enzimáticos, favoreciendo la estabilidad de las membranas celulares y la conservación de la funcionalidad del aparato fotosintético (Zagoskina et al., 2023).

Figura 6.

Función antioxidante de los polifenoles frente a las especies reactivas de oxígeno en células vegetales



Nota. Esquema que representa el papel de los compuestos fenólicos en la protección celular frente al estrés oxidativo. Diversas especies reactivas de oxígeno (ROS), entre ellas el anión superóxido (O₂^{•-}), el radical hidroperoxilo (HO₂[•]), el radical hidroxilo (HO[•]), el peróxido

de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), pueden provocar daño oxidativo cuando se acumulan en los tejidos vegetales. Los polifenoles actúan como antioxidantes no enzimáticos capaces de neutralizar estas especies reactivas y contribuir al mantenimiento del equilibrio redox celular, reduciendo el desarrollo del estrés oxidativo. Adaptado de Zagorskina et al. (2023).

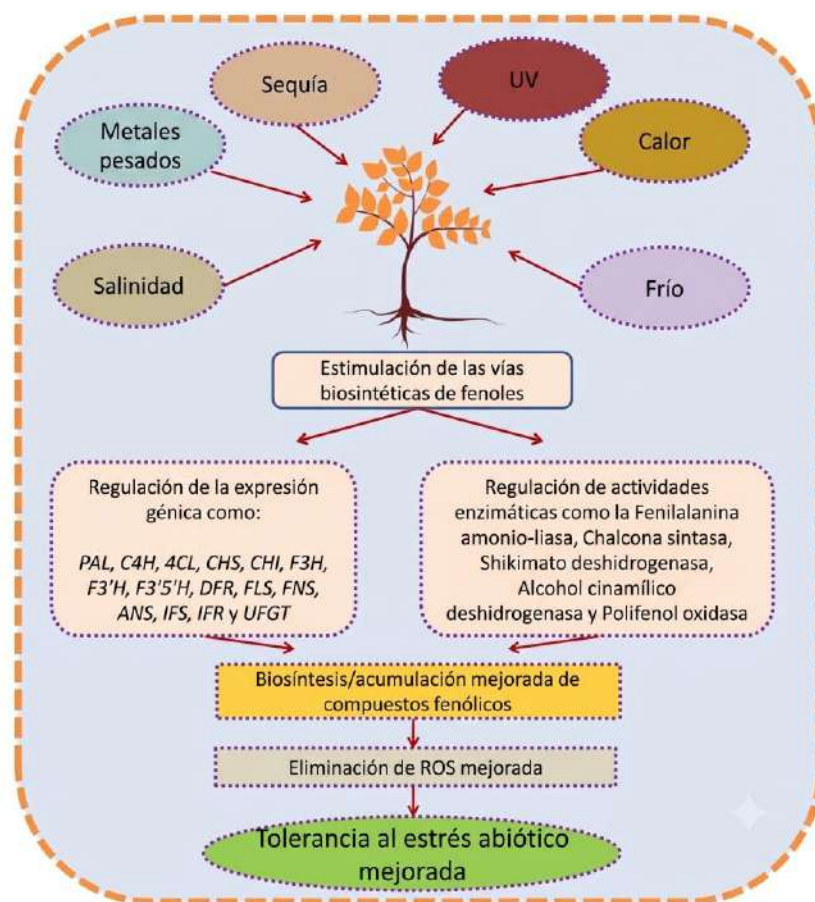
2.1.4.3 Reprogramación metabólica inducida por el estrés. La integración de los diversos factores de estrés ambiental y su papel en la activación de las rutas biosintéticas de estos compuestos defensivos se esquematiza en la **Figura 7**. Desde esta perspectiva, la capacidad antioxidante de las plantas está determinada no solo por la presencia de compuestos fenólicos, sino también por la reprogramación del metabolismo secundario que estimula su biosíntesis durante el estrés. Este proceso está regulado por la activación coordinada de enzimas de la ruta fenilpropanoide, entre las que destacan la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la chalcona sintasa (CHS), enzimas clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos y flavonoides con función protectora (Rao & Zheng, 2025).

Además de participar en la biosíntesis de antioxidantes solubles, la vía de los fenilpropanoides interviene en la formación de lignina y en la remodelación de la pared celular, favoreciendo la resistencia estructural de los tejidos vegetales bajo condiciones de estrés. En este contexto, se ha descrito un incremento en la expresión de genes como CCR (cinnamoyl-CoA reductase), encargado de catalizar la reducción de derivados de hidroxycinnamoyl-CoA hacia aldehídos precursores de lignina; CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase), responsable de convertir dichos aldehídos en alcoholes monolignoles; y POD (peroxidases), conjunto de enzimas que catalizan la polimerización oxidativa de estos monolignoles durante la formación de la pared celular. La activación de estas enzimas promueve el reforzamiento de la pared celular,

reduce su permeabilidad y favorece la adaptación de las plantas a condiciones de estrés, especialmente ante la deficiencia de fósforo y nitrógeno (Ninkuu et al., 2025).

Figura 7.

Participación de los compuestos fenólicos en la respuesta de las plantas al estrés abiótico



Nota. Representación esquemática de la respuesta del metabolismo fenólico frente a diferentes factores de estrés abiótico, como la sequía, la radiación ultravioleta, las temperaturas extremas, la salinidad y los metales pesados. Se ilustra cómo estas condiciones activan rutas biosintéticas mediante la regulación de genes y enzimas clave, promoviendo la acumulación de compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Como consecuencia, se favorece la eliminación

de especies reactivas de oxígeno (ROS), el mantenimiento del equilibrio redox celular y el incremento de la tolerancia de las plantas al estrés ambiental. Adaptado de Sharma et al. (2019).

2.1.4.4 Integración con la fotosíntesis y la respuesta antioxidante. La acumulación de compuestos fenólicos representa una respuesta adaptativa que contribuye a preservar la integridad estructural y funcional del aparato fotosintético bajo condiciones de estrés. Diversos flavonoles se localizan preferencialmente en células que contienen cloroplastos, lo que evidencia un estrecho acoplamiento entre el metabolismo fenólico y la actividad fotosintética. Dado que el cloroplasto constituye una de las principales fuentes de ROS bajo condiciones de estrés, el incremento de antioxidantes fenólicos contribuye a reforzar el sistema de protección redox alrededor de los procesos fotosintéticos, favoreciendo la conservación de pigmentos, proteínas y membranas celulares (Zagoskina et al., 2023; Sharma et al., 2019).

De manera complementaria, los flavonoides participan en las redes antioxidantes asociadas al ciclo ascorbato–peroxidasa, contribuyendo a la eliminación de H_2O_2 y al mantenimiento del equilibrio redox celular. Tras neutralizar especies reactivas, estos metabolitos pueden regenerarse mediante mecanismos dependientes de ácido ascórbico, integrándose funcionalmente con los sistemas antioxidantes enzimáticos y fortaleciendo la capacidad de respuesta de las plantas frente al estrés oxidativo (Sharma et al., 2019; Rao & Zheng., 2025).

La limitación de nutrientes esenciales, en particular de nitrógeno, fósforo y potasio, desencadena respuestas fisiológicas que incluyen el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la vía de los fenilpropanoides. En consecuencia, parte del carbono asimilado durante la fotosíntesis se destina a la biosíntesis de compuestos fenólicos y flavonoides, cuya acumulación contribuye a mantener la homeostasis redox, reforzar la estructura celular e incrementar la tolerancia de las plantas al estrés (Ninkuu et al., 2025).

En conjunto, estos antecedentes sugieren que matrices vegetales ricas en compuestos fenólicos, como la pulpa de café, podrían potenciar mecanismos antioxidantes ya presentes en las plantas sometidas a estrés (Bulgari et al., 2019; Martínez et al., 2024). Aunque la respuesta final depende de la composición del material vegetal y de la interacción con el metabolismo propio de cada especie, la evidencia disponible indica que estos compuestos pueden contribuir a disminuir el estrés oxidativo, preservar la integridad del aparato fotosintético y favorecer una mayor tolerancia frente al fotodaño inducido por alta irradiancia (Martínez et al., 2024).

2.1.5 Parámetros morfológicos y fisiológicos del crecimiento en copoazú

2.1.5.1 Morfología vegetal. La morfología vegetal comprende el estudio de la forma, estructura y organización de los órganos de las plantas, permitiendo describir características asociadas con su crecimiento, desarrollo y adaptación al ambiente. En especies tropicales perennes como el copoazú (*Theobroma grandiflorum*), el análisis morfológico constituye una herramienta importante para evaluar el vigor vegetativo y el crecimiento de las plantas frente a diferentes condiciones de cultivo (Taiz et al., 2015).

El copoazú presenta una elevada variabilidad morfológica, atribuida en parte a su proceso de domesticación relativamente reciente y a la amplia diversidad genética existente en las poblaciones amazónicas. En condiciones naturales puede alcanzar alturas cercanas a los 30 m, mientras que en sistemas productivos su crecimiento suele mantenerse entre 5 y 10 m, e incluso por debajo de los 3 m mediante prácticas de poda destinadas a facilitar el manejo agronómico y la cosecha (Escobar et al., 2009).

Su sistema radical está conformado por una raíz principal pivotante acompañada por raíces laterales que se distribuyen radialmente en el suelo. La raíz principal proporciona el soporte mecánico de la planta y facilita el acceso al agua almacenada en los horizontes más

profundos del suelo, mientras que las raíces secundarias desempeñan un papel fundamental en la absorción de agua y nutrientes disponibles en las capas superficiales. En este contexto, variables como la longitud de la raíz principal, la longitud total del sistema radical y el volumen radicular son indicadores ampliamente utilizados para evaluar el establecimiento de la planta y su capacidad para explorar el suelo (Escobar et al., 2009).

En la parte aérea, el copoazú desarrolla un tallo con crecimiento simpodial y una ramificación característica del género *Theobroma*. Sus hojas son simples, alternas y de gran tamaño, presentando tonalidades rojizas durante los estados juveniles que evolucionan hacia una coloración verde brillante al alcanzar la madurez (Escobar et al., 2009; Rodríguez & Hernández., 2025). El desarrollo foliar constituye un componente fundamental del crecimiento vegetativo, ya que determina la superficie disponible para la captura de radiación y la producción de fotoasimilados. Por ello, variables como la longitud, el ancho y el área foliar son ampliamente utilizadas para evaluar el crecimiento y la adaptación de las plantas a diferentes condiciones ambientales (Salazar et al., 2018).

En conjunto, los parámetros morfológicos proporcionan información sobre el desarrollo estructural del copoazú y permiten evaluar la respuesta de la planta frente a diferentes condiciones ambientales y prácticas de manejo agronómico (Poorter et al., 2012).

2.1.5.2 Fisiología vegetal. La fisiología vegetal comprende el estudio de los procesos funcionales que regulan el crecimiento, el desarrollo y la adaptación de las plantas a las condiciones del entorno. Entre estos procesos se encuentran la absorción de agua y nutrientes, la fotosíntesis, la respiración y la distribución de fotoasimilados hacia los distintos órganos de la planta, los cuales determinan la acumulación de biomasa y, en consecuencia, su desempeño productivo (Taiz et al., 2015).

El copoazú es una especie originaria del sotobosque amazónico y se considera adaptada a condiciones de sombreado parcial durante sus primeras etapas de desarrollo. Al igual que otras especies del género *Theobroma*, presenta metabolismo fotosintético C3, característico de plantas adaptadas a ambientes húmedos y con disponibilidad moderada de radiación solar. Esta condición explica la sensibilidad de las plántulas frente a cambios bruscos en la intensidad lumínica y la necesidad de una adaptación progresiva a condiciones de mayor exposición solar (Tratado de Cooperación Amazónica, FAO., 1999).

La disponibilidad de luz es uno de los factores ambientales que más influye sobre el funcionamiento fisiológico de la planta. Variaciones en la intensidad lumínica modifican procesos como la expansión foliar, el desarrollo radical, la distribución de biomasa y la capacidad fotosintética, generando respuestas adaptativas orientadas a optimizar el aprovechamiento de los recursos disponibles (Banguero et al., 2015).

Aunque el área foliar corresponde a una característica morfológica, constituye un indicador indirecto del desempeño fisiológico, debido a su estrecha relación con la capacidad de interceptación de radiación, el intercambio gaseoso y la producción de biomasa (Taiz et al., 2015; Banguero et al., 2015).

Uno de los principales resultados de la actividad fisiológica vegetal es la producción de biomasa, entendida como la acumulación de materia orgánica generada a partir de la fotosíntesis. La acumulación de biomasa es el resultado de la integración de procesos fisiológicos como la captura de energía lumínica, la fijación fotosintética de carbono y la partición de fotoasimilados entre los órganos de la planta, por lo que constituye un indicador confiable de su crecimiento y funcionamiento fisiológico. Por esta razón, la biomasa seca de los diferentes órganos vegetales es ampliamente utilizada como un indicador integrador del crecimiento y del funcionamiento fisiológico de la planta frente a diferentes condiciones ambientales o tratamientos agronómicos (Poorter et al., 2012).

En conjunto, el área foliar, el desarrollo del sistema radical y la acumulación de biomasa constituyen indicadores integradores del crecimiento vegetal que permiten evaluar la respuesta fisiológica del copoazú frente a cambios en la disponibilidad de luz y a la aplicación de bioestimulantes. Estas variables proporcionan una base para interpretar los cambios observados en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Poorter et al., 2012; Taiz et al., 2015).

2.1.6 Propiedades fisicoquímicas del suelo

Las propiedades fisicoquímicas del suelo constituyen indicadores fundamentales de su fertilidad, ya que determinan la disponibilidad, retención y transformación de los nutrientes esenciales para el crecimiento, desarrollo y metabolismo de las plantas (López et al., 2002).

El nitrógeno (N), el fósforo (P), el potasio (K), el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) son macronutrientes indispensables para el crecimiento y el metabolismo vegetal, al participar en procesos como la síntesis de proteínas, el desarrollo radicular, la fotosíntesis y el mantenimiento del equilibrio osmótico. Sin embargo, su disponibilidad en el suelo depende de propiedades fisicoquímicas como el pH, la materia orgánica y la capacidad de intercambio catiónico (CIC),

que regulan su retención, movilidad y absorción por las plantas, y pueden modificarse mediante la aplicación de enmiendas orgánicas (López et al., 2002; Rodríguez et al., 2021).

De manera complementaria, micronutrientes como hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), boro (B) y molibdeno (Mo), son indispensables para el funcionamiento del metabolismo vegetal, ya que participan como cofactores de numerosas enzimas y en la regulación de procesos fisiológicos asociados con el metabolismo y la homeostasis redox. Su disponibilidad en el suelo también depende de propiedades como el pH, el contenido de materia orgánica y la capacidad de intercambio catiónico (CIC), por lo que su evaluación contribuye a caracterizar la fertilidad química (López et al., 2002; Barrow & Hartemink., 2023).

El contenido de materia orgánica, el pH y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) constituyen algunos de los principales indicadores de la fertilidad química del suelo. La materia orgánica mejora la estructura del suelo y favorece la retención de agua y nutrientes gracias a la presencia de grupos funcionales capaces de adsorber y complejar cationes, contribuyendo así a incrementar la disponibilidad de nutrientes (López et al., 2002). Asimismo, el pH controla la solubilidad y movilidad de numerosos elementos minerales, mientras que la CIC representa la capacidad del suelo para adsorber e intercambiar cationes, regulando su almacenamiento y suministro a las plantas (López et al., 2002; Barrow & Hartemink., 2023).

En este contexto, la incorporación de enmiendas orgánicas derivadas de residuos del café representa una estrategia prometedora para mejorar las propiedades fisicoquímicas del suelo, optimizar la disponibilidad de nutrientes y favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas. Subproductos como la pulpa y la cascarilla contienen carbohidratos, proteínas, minerales, compuestos fenólicos y componentes lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosas y lignina), cuya

descomposición favorece la incorporación gradual de nutrientes y la formación de materia orgánica estable en el suelo (Alves et al., 2017).

Por ello, estos materiales pueden ser aprovechados mediante procesos como el compostaje y el vermicompostaje, que transforman los residuos en enmiendas orgánicas de mayor estabilidad y reducen los impactos ambientales derivados de su disposición. Asimismo, la liberación progresiva de nutrientes y la interacción de sus compuestos bioactivos con la microbiota del suelo favorecen los procesos de mineralización, contribuyen al mejoramiento de la fertilidad del suelo y aumentan la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Alves et al., 2017).

2.1.7 Análisis bioquímico de compuestos funcionales en el tejido vegetal

Los metabolitos primarios y secundarios desempeñan un papel fundamental en el funcionamiento fisiológico de las plantas y en su capacidad de adaptación al ambiente. Mientras que los carbohidratos y las proteínas participan en procesos relacionados con el suministro de energía, el crecimiento y el metabolismo, los compuestos fenólicos y los flavonoides contribuyen a la regulación de la homeostasis redox y a la activación de mecanismos de defensa frente al estrés (Kumar et al., 2023). En el caso del copoazú (*Theobroma grandiflorum*), la presencia de estos metabolitos ha sido reportada en tejidos vegetativos y en los diferentes componentes del fruto, donde están asociados con sus propiedades nutricionales, funcionales y antioxidantes (Campos et al., 2021). Por ello, su cuantificación constituye una herramienta ampliamente utilizada para evaluar el estado fisiológico de las plantas y los cambios inducidos por diferentes tratamientos o condiciones ambientales (Kumar et al., 2023).

2.1.7.1 Clorofilas y carotenoides. Las clorofilas son pigmentos tetrapirrólicos esenciales para la absorción de energía luminosa y su transferencia hacia los centros de reacción de los fotosistemas. Por esta razón, su concentración se considera un indicador indirecto de la capacidad fotosintética del tejido vegetal, ya que una disminución en su contenido suele reflejar una menor eficiencia en la captura de energía y, en consecuencia, una reducción en la fijación fotosintética de CO₂. En el copoazú, la cuantificación de estos pigmentos se ha utilizado para evaluar el estado fisiológico de las hojas y su respuesta frente a diferentes condiciones de estrés (Oliveira da Conceição et al., 1997).

Por otro lado, Los carotenoides constituyen pigmentos accesorios que participan activamente en los mecanismos de fotoprotección del aparato fotosintético. Su función principal consiste en disipar el exceso de energía luminosa y limitar el daño oxidativo ocasionado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Demmig-Adams & Adams., 1996). Además, en el copoazú se ha reportado la presencia de carotenoides, como β -caroteno, principalmente en la pulpa del fruto, lo que evidencia la importancia fisiológica y nutricional de este grupo de pigmentos (Campos et al., 2021).

2.1.7.2 Proteínas vegetales. Las proteínas constituyen uno de los principales componentes funcionales de las células vegetales debido a su participación en procesos enzimáticos, transporte de metabolitos, señalización y mecanismos de respuesta frente al estrés. Su contenido total refleja, de manera general, la actividad metabólica del tejido, por lo que cambios en su concentración pueden indicar alteraciones en procesos como la fotosíntesis, la respiración y la biosíntesis de metabolitos (Taiz et al., 2015).

En el copoazú, además de su función fisiológica en los tejidos vegetales, las semillas presentan un contenido proteico importante asociado a su aprovechamiento agroindustrial y a la formación de compuestos relacionados con las características sensoriales del *cupulate* (Campos et al., 2021). Asimismo, bajo condiciones de estrés se ha reportado una disminución en el contenido de proteínas solubles, evidenciando alteraciones en el metabolismo celular (Oliveira da Conceição et al., 1997).

2.1.7.3 Compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios caracterizados por la presencia de uno o más grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos. En las plantas desempeñan funciones esenciales en los mecanismos de defensa y en la respuesta frente al estrés, debido a su capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS), mantener la homeostasis redox y proteger las células del daño oxidativo. En el copoazú, los compuestos fenólicos se encuentran entre los principales metabolitos bioactivos identificados en la pulpa y las semillas, contribuyendo a su capacidad antioxidante y a su potencial funcional. Por esta razón, la cuantificación de fenoles totales se utiliza ampliamente como un indicador bioquímico para analizar la acumulación de metabolitos secundarios y evaluar la respuesta fisiológica de los tejidos vegetales ante diferentes estímulos ambientales (Oliveira da Conceição et al., 1997; Carmona et al., 2021).

2.1.7.4 Flavonoides. Los flavonoides corresponden a una de las principales familias de metabolitos fenólicos y participan en diversos mecanismos fisiológicos asociados con la fotoprotección, la señalización celular y la defensa antioxidante.

La presencia de grupos hidroxilo en su estructura química favorece su capacidad para estabilizar especies radicalarias y especies reactivas de oxígeno (ROS), contribuyendo a mantener la homeostasis redox durante condiciones de estrés ambiental (Sharma et al., 2019). En el copoazú se han identificado diferentes flavonoides como parte de su perfil fenólico, los cuales participan en su capacidad antioxidante y complementan el conjunto de metabolitos bioactivos presentes en esta especie (Campos et al., 2021). Por ello, su cuantificación junto con los fenoles totales permite una mejor interpretación de la respuesta antioxidante del tejido vegetal (Sharma et al., 2019).

2.1.7.5 Azúcares totales. Los azúcares solubles representan una fuente inmediata de energía y constituyen un componente central del metabolismo del carbono en las plantas. Además de participar en procesos respiratorios y biosintéticos, intervienen en el ajuste osmótico, la señalización metabólica y la respuesta frente al estrés. En el copoazú, los carbohidratos constituyen una fracción importante de la composición de la pulpa, mientras que en los tejidos vegetativos actúan como moléculas centrales del metabolismo energético y del transporte de carbono. Su cuantificación permite evaluar el equilibrio entre la producción de fotoasimilados mediante la fotosíntesis y su demanda para procesos como el crecimiento, el desarrollo y la respuesta adaptativa al estrés (Jeandet et al., 2022). En este contexto, el contenido de azúcares totales se emplea como un indicador bioquímico del estado fisiológico de los tejidos vegetales (Saddhe et al., 2021).

2.2 Antecedentes

El uso de bioestimulantes de origen natural han cobrado importancia por su capacidad para mejorar la eficiencia en el uso de nutrientes, estimular el crecimiento vegetal e incrementar la tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés abiótico. Estudios recientes han

demostrado que compuestos derivados de extractos vegetales y residuos agroindustriales pueden regular procesos fisiológicos y metabólicos asociados con la fotosíntesis, la respuesta antioxidante y el desarrollo vegetal, posicionándose como alternativas sostenibles frente al uso intensivo de fertilizantes químicos (Rouphael & Colla., 2020; Zhang et al., 2024).

Dentro de este contexto, diferentes investigaciones han evidenciado que la respuesta de las plantas frente a la aplicación de bioestimulantes está determinada por factores como su composición química, la especie vegetal evaluada y la naturaleza del estrés ambiental. Como ejemplo, Vitale et al. (2021) analizaron la interacción entre diferentes condiciones de iluminación y la aplicación de un bioestimulante de origen vegetal en soya (*Glycine max*), reportando mejoras significativas en la eficiencia fotosintética, la acumulación de pigmentos fotosintéticos y la capacidad antioxidante de las plantas. Los autores señalaron que estos productos favorecen la adaptación frente al estrés lumínico mediante la regulación integrada de procesos fotosintéticos y mecanismos antioxidantes, demostrando que su acción trasciende el estímulo del crecimiento al involucrar respuestas bioquímicas asociadas con la protección celular.

De manera similar, Buthelezi et al. (2024) reportaron que la aplicación de extracto de semillas de moringa en plantas expuestas a estrés térmico favoreció la acumulación de carotenoides y fitohormonas, además de disminuir los indicadores asociados al estrés oxidativo. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los bioestimulantes de origen natural pueden modular respuestas fisiológicas y metabólicas relacionadas con la protección celular, contribuyendo a una mayor tolerancia de las plantas ante condiciones ambientales adversas.

Paralelamente, los residuos agroindustriales han despertado un creciente interés como fuente de bioestimulantes de bajo costo y alto valor agregado. Entre ellos, la pulpa de café

destaca por su potencial como fuente de compuestos bioactivos, debido a su elevado contenido de polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, minerales y otros metabolitos con actividad antioxidante (Martínez et al., 2019; Bomfim et al., 2023). Diversos estudios han resaltado además la importancia de valorizar este residuo como estrategia de economía circular, reduciendo simultáneamente el impacto ambiental derivado de su disposición inadecuada.

Los estudios relacionados con el aprovechamiento agrícola de residuos derivados del café han evidenciado resultados favorables. Serna et al. (2018) evidenciaron la capacidad antioxidante de extractos de pulpa de café, mientras que Rodríguez (2021) reportó que la aplicación de borras de café descafeinadas disminuyó la severidad de las lesiones provocadas por *Botrytis cinerea* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*). Estos resultados sugieren que los residuos del café pueden influir en los mecanismos de defensa vegetal, posiblemente asociados con la presencia de compuestos fenólicos y otros metabolitos bioactivos.

En particular, los estudios centrados en el aprovechamiento de la pulpa de café han evidenciado su potencial como insumo agrícola. Sery et al. (2025) reportaron que el compost elaborado a partir de pulpa y cascarilla de café favoreció significativamente el incremento de la altura, la biomasa y el desarrollo radicular en plántulas de café robusta. Por su parte, Cuesta et al. (2025) demostraron que la bioconversión de pulpa de café mediante *Hermetia illucens* produjo un fertilizante orgánico capaz de mejorar la germinación y el crecimiento temprano de tomate cuando fue aplicado en concentraciones adecuadas. En conjunto, estos resultados indican que los residuos del café representan no solo una fuente de nutrientes, sino también una matriz rica en compuestos bioactivos con capacidad para influir sobre procesos fisiológicos asociados con el establecimiento, crecimiento y desarrollo vegetal.

De manera complementaria, distintos estudios han evaluado estrategias destinadas a mejorar la extracción de metabolitos bioactivos presentes en residuos del café. Martins et al. (2011) y Lee et al. (2023) evidenciaron que la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido favorece la recuperación de compuestos fenólicos, incrementando la eficiencia del proceso de extracción a partir de matrices agroindustriales, mientras que Zuorro & Lavecchia (2012) demostró que el empleo de solventes hidroalcohólicos incrementa significativamente la eficiencia de extracción, facilitando el aprovechamiento de estos metabolitos para aplicaciones agrícolas e industriales.

En cuanto al copoazú (*Theobroma grandiflorum*), los estudios disponibles se han orientado principalmente hacia la caracterización de sus componentes químicos y sus aplicaciones agroindustriales. Investigaciones recientes han demostrado que la pulpa y las semillas constituyen fuentes relevantes de compuestos fenólicos, flavonoides, minerales y metabolitos antioxidantes (Velásquez et al., 2025; Carmona et al., 2021). Asimismo, Rogez et al. (2004) reportaron concentraciones de compuestos fenólicos superiores a las encontradas en otras frutas tropicales ampliamente reconocidas por su actividad antioxidante, mientras que Galeano y Paladines (2012) identificaron flavonoides como catequina y quercetina, responsables de parte importante de su capacidad antioxidante.

Desde el punto de vista fisiológico, Oliveira da Conceição et al. (1997) observaron que hojas sanas de copoazú presentan mayores contenidos de clorofilas, carotenoides, proteínas y azúcares solubles que hojas afectadas por enfermedades, lo cual demuestra que estos metabolitos representan indicadores bioquímicos para evaluar el estado fisiológico de la planta y su desempeño fotosintético. En conjunto, estos resultados sugieren que el metabolismo del copoazú responde de manera importante frente a condiciones de estrés, aunque todavía existen pocos

estudios orientados a evaluar estrategias de bioestimulación que permitan modular dicha respuesta.

Finalmente, también se ha documentado que la incorporación de residuos orgánicos derivados del café mejora diferentes propiedades fisicoquímicas del suelo. Diversas investigaciones, entre ellas las realizadas por Rodríguez (2021), Alves et al. (2017), Bomfim et al. (2023) y Sánchez et al. (2023), han evidenciado que el uso de residuos del café como enmiendas orgánicas mejora propiedades químicas y biológicas del suelo, incluyendo el aumento de la materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico, la disponibilidad de nutrientes y la actividad microbiana. Estos cambios favorecen la calidad del suelo y generan un ambiente más adecuado para el establecimiento, crecimiento y desarrollo vegetal.

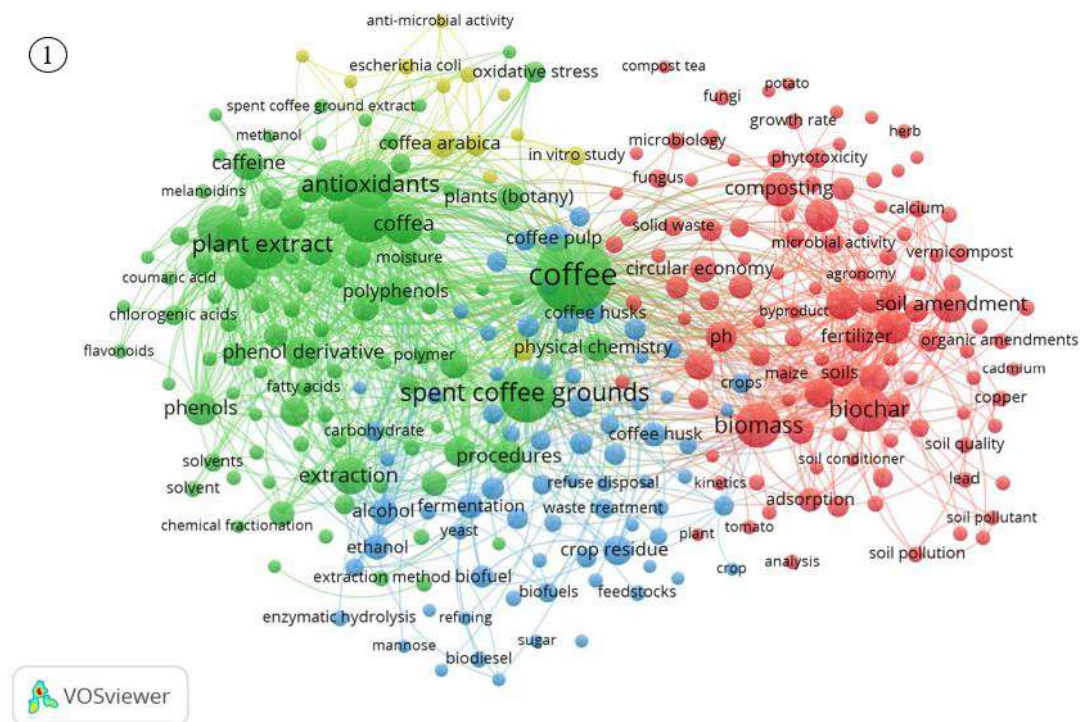
A pesar de estos avances, la literatura científica evidencia un vacío de conocimiento importante respecto al empleo de pulpa de café como bioestimulante en especies amazónicas de importancia económica como el copoazú. La mayoría de los trabajos disponibles se han enfocado en cultivos agrícolas tradicionales, en procesos de compostaje o en la caracterización química del residuo, mientras que son escasos los estudios que evalúan simultáneamente sus efectos sobre variables morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y edáficas bajo condiciones de estrés lumínico. En este contexto, esta investigación contribuye al conocimiento sobre el uso de la pulpa de café seca como bioestimulante natural, evaluando su capacidad para modificar la respuesta fisiológica del copoazú y aportar alternativas sostenibles para la valorización de un subproducto agroindustrial generado en la región amazónica.

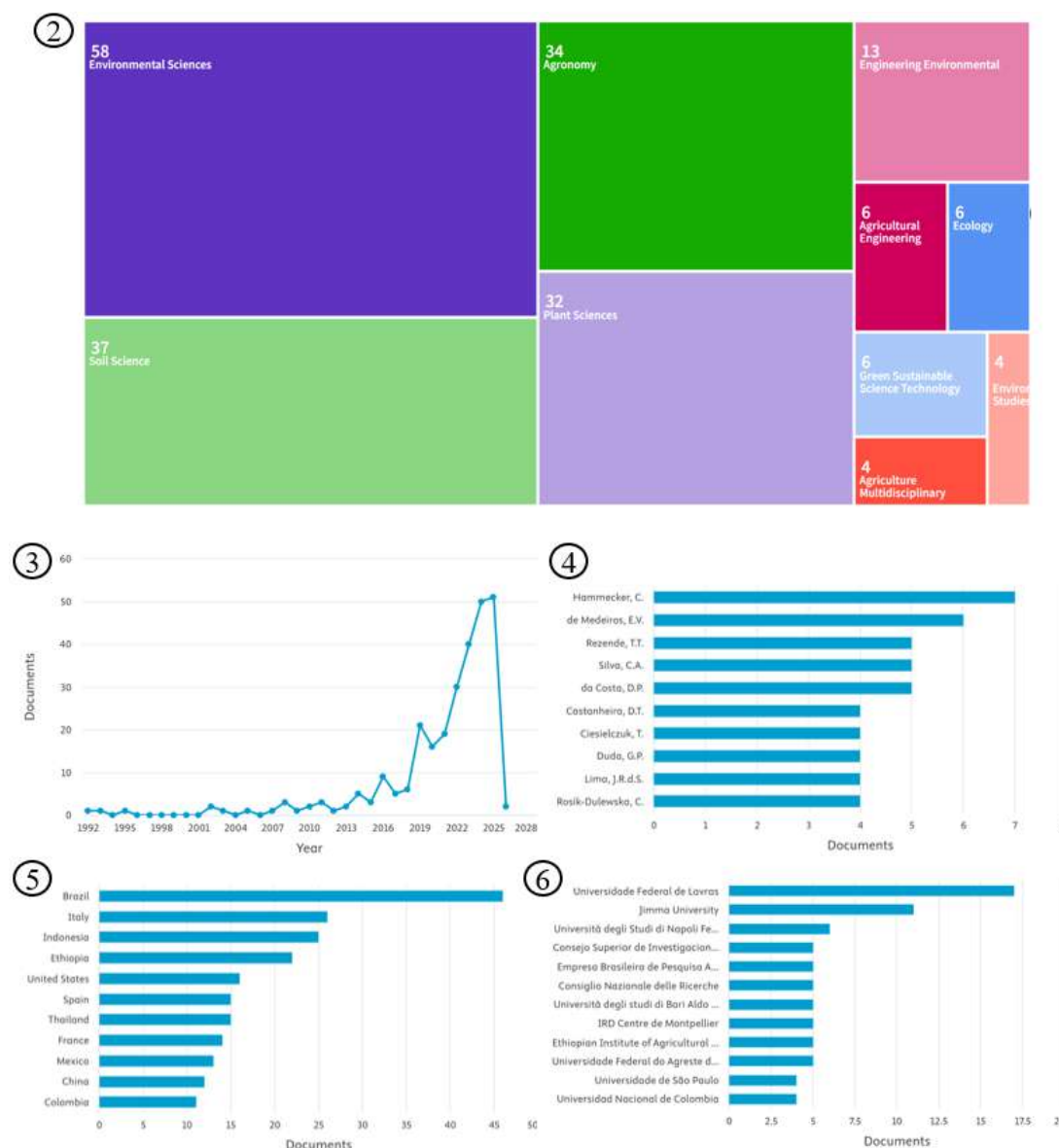
2.2.1 Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo, basado en la revisión bibliográfica en las bases de datos Scopus y Web of Science evidenció una investigación interdisciplinar en torno al

Figura 8.

①





Nota. (1) Mapa de co-ocurrencia de términos relacionados con la investigación de subproductos del café y sus aplicaciones agrícolas; (2) categorías temáticas de investigación identificadas en la literatura científica; (3) evolución anual del número de documentos publicados; (4) principales autores según número de documentos publicados; (5) distribución de documentos por país; y (6) distribución de documentos por organización o institución de afiliación. Elaboración mediante VOSviewer, Scopus y Web of Science a partir de la base bibliográfica analizada.

2.2.1.1 Mapa de co-ocurrencia (VOSviewer). El mapa de co-ocurrencia de palabras clave (**Figura 8.1**) muestra un campo de investigación estructurado alrededor de términos centrales como *coffee* y *spent coffee grounds*, que conectan diferentes líneas temáticas. Un primer clúster (*verde*) agrupa términos relacionados con compuestos bioactivos y antioxidantes, como *antioxidants*, *polyphenols*, *phenols*, *chlorogenic acids* y *caffeine*, reflejando el interés por la caracterización y aprovechamiento biológico de los residuos del café. Un segundo clúster (*rojo*) reúne términos asociados a aplicaciones agrícolas, incluyendo *soil amendment*, *composting*, *vermicompost*, *fertilizer*, *biochar*, *plant growth* y *soil quality*, evidenciando el estudio de estos residuos como enmiendas orgánicas y su efecto sobre el suelo y el crecimiento vegetal. Por último, el clúster (*azul*) integra términos vinculados con procesos de valorización industrial, como *fermentation*, *biofuel*, *biodiesel* y *waste treatment*, indicando una línea de investigación orientada al aprovechamiento de los residuos del café para la obtención de bioproductos y bioenergía. En conjunto, el mapa evidencia un enfoque multidisciplinario que abarca la valorización química, agrícola e industrial de los subproductos del café.

2.2.1.2 Evolución y estructura de la producción científica sobre subproductos del café.

Los indicadores bibliométricos complementarios de la **Figura 8** evidencian que la investigación sobre subproductos del café constituye un campo en expansión, con un marcado crecimiento en la producción científica durante los últimos años, especialmente a partir de 2019. Las categorías temáticas predominantes corresponden a Ciencias Ambientales, Ciencia del Suelo, Agronomía y Ciencias Vegetales, lo que confirma un enfoque centrado en la valorización de residuos del café y sus aplicaciones agrícolas y ambientales.

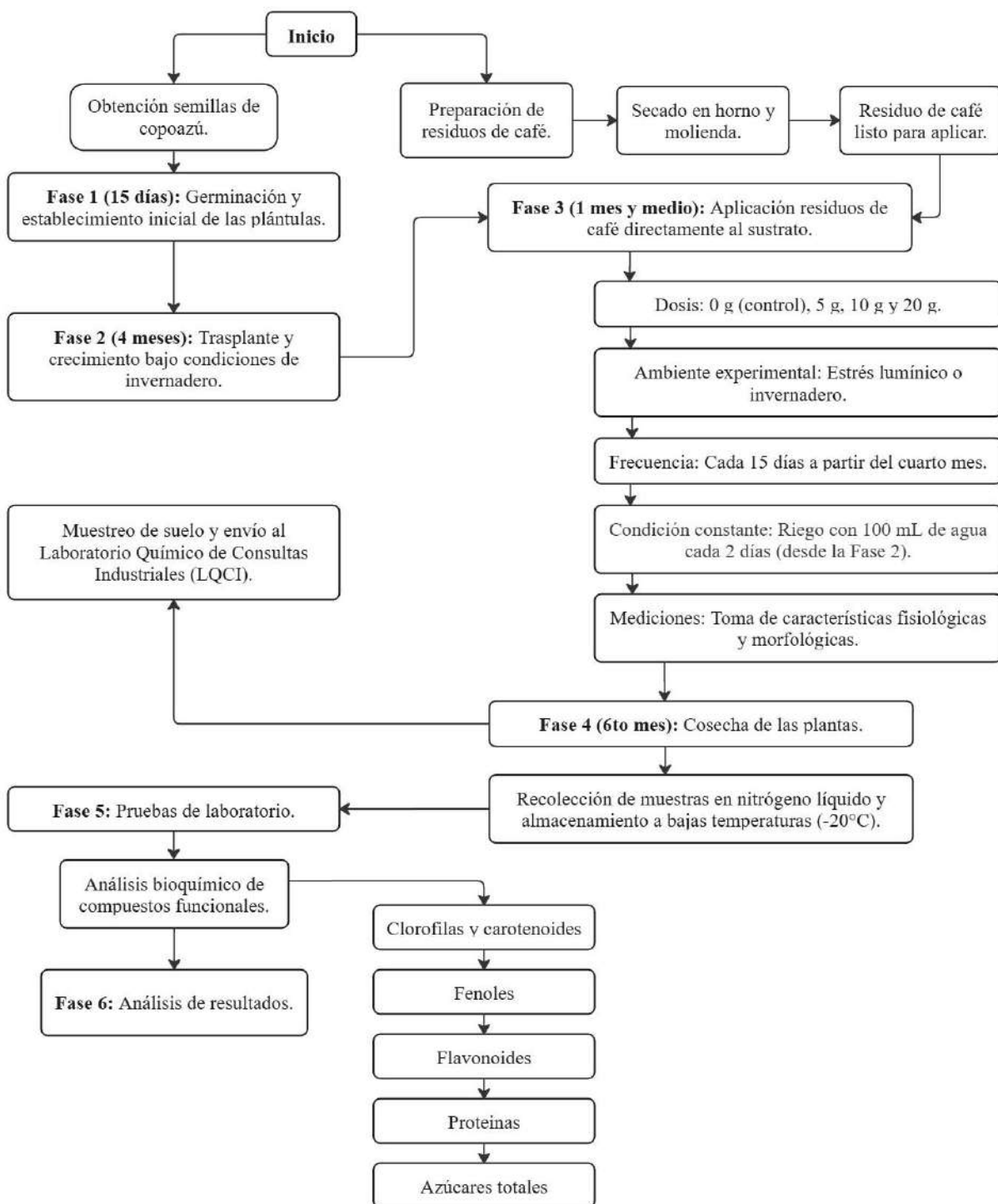
La producción científica presenta un liderazgo distribuido entre diversos autores e instituciones, destacándose universidades y centros de investigación con trayectoria en

agricultura, suelos y manejo de residuos agroindustriales. A nivel geográfico, Brasil concentra la mayor cantidad de publicaciones, seguido por países como Italia, Indonesia y Etiopía, reflejando la convergencia entre regiones con alta producción cafetera y países con capacidad científica en áreas como ingeniería ambiental, agroindustria y economía circular. En conjunto, estos resultados reflejan que la valorización de los subproductos del café constituye una línea de investigación de creciente relevancia internacional, orientada al desarrollo de estrategias sostenibles que permitan reducir el impacto ambiental asociado a la generación de residuos y promover su reincorporación en sistemas agrícolas bajo principios de economía circular.

3 Metodología

Figura 9.

Flujograma del procedimiento metodológico experimental



Nota. Esquema secuencializado de las fases operativas aplicadas en la investigación, detallando la interacción entre el manejo de tratamientos, la toma de datos morfofisiológicos y el procesamiento final de la información.

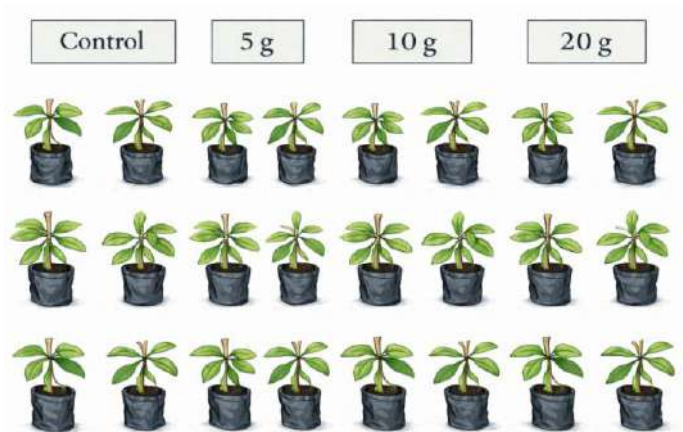
El procedimiento metodológico experimental desarrollado en este estudio se estructuró de forma secuencial mediante una serie de etapas interconectadas, las cuales abarcan desde la preparación del material vegetal y el establecimiento de los tratamientos, hasta la medición de variables y el análisis estadístico correspondiente (**Figura 9**). A partir de este planteamiento experimental, se implementó un diseño completamente aleatorizado con el propósito de evaluar el efecto de la pulpa de café sobre el crecimiento y la respuesta fisiológica de plantas de *Theobroma grandiflorum* (copoazú).

El estudio consideró dos condiciones de cultivo (polisombra al 65% y alta irradiancia) y cuatro niveles de aplicación de pulpa de café como enmienda orgánica sólida (0, 5, 10 y 20 g). La combinación de estos factores generó ocho tratamientos experimentales, cada uno conformado por seis réplicas, para un total de 48 unidades experimentales (**Tabla 1**). Las plantas fueron seleccionadas con base en criterios de homogeneidad y asignadas aleatoriamente a los tratamientos, garantizando que todas las unidades experimentales tuvieran la misma probabilidad de recibir cualquiera de las combinaciones evaluadas. La aleatorización y la replicación permitieron minimizar sesgos experimentales y aumentar la confiabilidad de los resultados obtenidos (Birhane et al., 2014).

Tabla 1.*Distribución de tratamientos y unidades experimentales del estudio*

Nº	Especie	Condición	Tratamiento	Aplicación	Plantas	
1	Copoazú	Alta irradiancia	Pulpa de café 5 g	Enmienda orgánica	6	
2			Pulpa de café 10 g		6	
3			Pulpa de café 20 g		6	
4		Sombra	Pulpa de café 5 g		6	
5			Pulpa de café 10 g		6	
6			Pulpa de café 20 g		6	
7		Control luz			6	
8		Control sombra			6	
Total					48	

Adicionalmente, se elaboró un mapa de ubicación de las plántulas para registrar la posición de cada unidad experimental dentro del arreglo (**Figura 10**). Con base en este mapa, las plantas fueron rotadas periódicamente dentro de su mismo tratamiento (intercambiando posiciones entre las seis plantas de cada grupo), con el fin de minimizar efectos de borde o de frontera, es decir, variaciones asociadas a ocupar posiciones periféricas frente a posiciones más centrales en la disposición. Esto mejora la trazabilidad del montaje y reduce posibles sesgos espaciales durante el desarrollo del experimento (Hartung et al., 2019).

Figura 10.*Distribución espacial de las unidades experimentales por tratamiento*

Nota. Esquema de la disposición de las plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) dentro de cada condición experimental. La distribución incluyó los tratamientos correspondientes a las dosis de pulpa de café (control, 5, 10 y 20 g por planta) y sus respectivas repeticiones. La misma organización espacial fue utilizada tanto para las plantas sometidas a alta irradiancia como para aquellas mantenidas en condiciones de invernadero.

3.1 Germinación y crecimiento de plantas de copoazú

Los frutos fueron adquiridos a través de la empresa Puramazonia Zomac SAS, ubicada en Florencia, Caquetá (Colombia). Posteriormente, las semillas fueron despulpadas utilizando cascarilla de arroz y desinfectadas mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v). A continuación, se dispusieron en cubetas de huevo, asegurando condiciones controladas que favorecieran la germinación de las semillas. Una vez ocurrió la emergencia de la radícula, las semillas fueron trasplantadas a bolsas que contenían 1600 g de sustrato, compuesto por 40% de tierra negra, 15% de cascarilla de arroz, 15% de arena, y 30% de compost (hojarasca). La siembra se realizó a una profundidad de 1 cm y con la radícula orientada hacia abajo. Posteriormente, las bolsas se mantuvieron bajo condiciones de sombra, considerando que el *Theobroma* es un género umbrófilo que requiere baja luminosidad para su desarrollo.

3.2 Preparación de residuos de café para su aplicación experimental

La pulpa de café utilizada en este estudio provino de *Coffea arabica*, incluyendo variedades como *Castillo*, *Colombia*, *Tabi*, *Geisha* y *Borbón Rosado*. Esta fue recolectada como subproducto proporcionado por la empresa “Café Hacienda Casablanca”, ubicada en Santander, vía Pamplona - Cúcuta. La pulpa del café fue secada en horno a 50 °C durante 3 días para minimizar la degradación de compuestos termolábiles. Una vez eliminado el mayor contenido de humedad, el material fue molido y conservado para su posterior aplicación siguiendo el

procedimiento propuesto por Krakowska et al. (2022), y Torres et al. (2019), quienes destacan la eficacia de los procesos de secado y molienda para preservar compuestos bioactivos y mejorar la estabilidad del material.

Este proceso de secado representó una etapa fundamental para la estabilización microbiológica de la pulpa de café, debido a que la reducción del contenido de humedad limita la disponibilidad de agua necesaria para el desarrollo y proliferación de microorganismos (Tapia et al., 2020). Además, favorece la conservación del material durante el almacenamiento al limitar los procesos de fermentación y deterioro microbiológico, permitiendo obtener una pulpa más estable para su aplicación experimental (Torres et al., 2019).

3.3 Tratamientos de bioestimulación con pulpa de café

Una vez seleccionados los grupos de plantas con crecimiento homogéneo para los tratamientos y controles, se estableció el diseño experimental descrito en la **Tabla 1**. Las plantas de copoazú, con cuatro meses de crecimiento, permanecieron inicialmente durante quince días bajo condiciones de invernadero como periodo de adaptación. Finalizado este periodo, las plantas se distribuyeron en dos ambientes de cultivo. Un grupo permaneció bajo las condiciones del invernadero, mientras que el otro se trasladó a un ambiente con mayor exposición a la radiación solar natural, conforme al diseño experimental.

La pulpa de café previamente pretratada (*Sección 3.2*) se aplicó sobre la superficie del sustrato en dosis de 5 g, 10 g y 20 g por planta, según el tratamiento correspondiente. Se realizaron cuatro aplicaciones, con una frecuencia de una aplicación cada quince días. En cada aplicación, el sustrato se removió superficialmente para favorecer la incorporación homogénea de la pulpa y facilitar el contacto del material con la zona radicular durante el riego.

Durante los dos meses de duración del experimento, todas las plantas recibieron 100 mL de agua cada dos días para mantener la humedad del sustrato y favorecer la liberación gradual de los compuestos bioactivos presentes en la pulpa de café. Este volumen se estableció mediante una estimación gravimétrica del contenido de humedad del sustrato. Para ello, se tomó una submuestra representativa obtenida a partir de 1600 g de sustrato fresco, la cual se secó en horno a 70 °C durante tres días, hasta alcanzar masa constante, para determinar la masa seca de referencia empleada en la estimación gravimétrica del contenido de humedad del sustrato, siguiendo el principio del método gravimétrico descrito por la Food and Agriculture Organization of the United Nations (2023).

Durante el desarrollo del ensayo, cada quince días se evaluaron los parámetros fisiológicos y morfológicos descritos en la *Sección 3.4*. Al finalizar el experimento, las plantas fueron colectadas y el material vegetal se separó en hojas y raíces para los análisis bioquímicos descritos en la *Sección 3.6*.

Por otro lado, con el fin de caracterizar las condiciones ambientales durante el desarrollo del experimento, se registraron la temperatura del aire y la humedad relativa en cuatro ocasiones mediante un medidor de temperatura y humedad Humidity & Temperature Meter (UNI-T), utilizando la sonda externa del equipo para la medición de la temperatura. Las plantas destinadas a la condición de sombra permanecieron durante todo el experimento bajo una cubierta de polisombra con un nivel de sombreo del 65 %, mientras que las plantas del tratamiento de mayor exposición a la radiación solar fueron mantenidas a cielo abierto.

Durante el periodo experimental, la temperatura del aire osciló entre 26,1 y 32,4 °C, mientras que la humedad relativa presentó valores entre 70 y 85 %, evidenciando variaciones propias de las condiciones climáticas durante el tiempo de evaluación.

Es importante señalar que, aunque se realizó el seguimiento de variables microclimáticas como la temperatura y la humedad relativa, no se efectuaron mediciones de la radiación fotosintéticamente activa (PAR o PPFD). En consecuencia, los resultados de este estudio corresponden a la comparación entre plantas cultivadas bajo dos condiciones de exposición a la radiación (una de mayor exposición solar y otra bajo polisombra al 65 %), sin que ello represente una cuantificación directa de la intensidad del estrés lumínico.

3.4 Toma de parámetros morfológicos y fisiológicos

La evaluación de las variables de crecimiento se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Aguilar y Quintanilla. (2018), con algunas modificaciones. Brevemente, se evaluaron variables morfológicas como altura de planta, diámetro del tallo, ancho y largo de las hojas; y fisiológicas como el área foliar, y porcentaje de biomasa, para relacionar el manejo inicial con el desempeño en invernadero.

3.4.1 Características morfológicas

La evaluación de las variables morfológicas clave (longitud del tallo, diámetro del tallo, y ancho y largo de las hojas) se llevó a cabo mediante mediciones manuales directas empleando instrumentos de medición convencionales de alta precisión. Esta aproximación metodológica se fundamenta en los criterios y descriptores estandarizados para el estudio morfoagronómico y fenotipado vegetal, con mediciones periódicas ajustadas a las condiciones y objetivos de esta investigación (Avendaño et al., 2014; Martínez et al., 2014). Las evaluaciones se realizaron con una periodicidad de 15 días a partir del momento en que se aplicaron los tratamientos, siguiendo los criterios técnicos descritos a continuación (**Figura 11**).

Figura 11.

Ubicación de las mediciones morfológicas realizadas en plántulas de copoazú



Nota. Representación de los puntos de medición utilizados para la evaluación del crecimiento vegetal en plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*). Se indican las variables morfológicas registradas durante el estudio: longitud del tallo, diámetro basal del tallo, longitud y ancho foliares.

- a) **Longitud del tallo:** La medición se hizo utilizando una cinta métrica flexible. La medición se realizó de forma vertical, extendiendo el instrumento desde una marca fija cercana a la superficie del sustrato hasta el meristema apical o yema terminal más alta de la plántula. Este procedimiento directo constituye un estándar práctico recomendado para cuantificar el crecimiento longitudinal del material vegetal bajo condiciones controladas (Avendaño et al., 2014).
- b) **Diámetro del tallo:** Se determinó mediante el uso de un calibrador vernier o pie de rey. Para estandarizar las lecturas y evitar variaciones o sesgos asociados a las irregularidades morfológicas de la base del tallo, las mordazas del instrumento se situaron fijamente a

una altura constante de 3 cm por encima del primer brote o cicatriz cotiledonal. El empleo de este instrumento de precisión se encuentra respaldado por los protocolos de selección de descriptores mínimos para el monitoreo del vigor y el crecimiento real en plantas de cacao (Martínez et al., 2014).

- c) **Ancho y largo de las hojas:** Para realizar un seguimiento longitudinal e individualizado de las hojas, inicialmente estas se marcaron en su orden cronológico de brotación empleando marquillas de colores. Se asignó el color naranja a la primera hoja emergida, seguido del morado para la segunda, negro para la tercera, rosado para la cuarta y blanco para la quinta. A partir de esta codificación, el largo máximo (desde la base del limbo hasta el ápice de la lámina foliar) y el ancho máximo de cada hoja seleccionada se midieron directamente utilizando una regla milimétrica rígida. Esta metodología de medición manual directa representa una técnica no destructiva validada dentro de los manuales gráficos de descriptores varietales para evaluar la evolución de las estructuras foliares de manera precisa (Avendaño et al., 2014; Martínez et al., 2014). Al igual que las demás variables, este proceso se ejecutó de forma continua cada 15 días.

3.4.2 Características fisiológicas

Las características fisiológicas se evaluaron mediante indicadores asociados al crecimiento y funcionamiento de las plantas, tales como el desarrollo radical, el área foliar y la acumulación de biomasa en hojas, tallo y raíz. Estas variables permiten valorar de manera integrada la capacidad de las plantas para captar y utilizar recursos, así como su respuesta a las condiciones ambientales y a los tratamientos aplicados (Taiz et al., 2015). En este estudio se evaluaron la longitud de la raíz, el área foliar y la biomasa de raíz, hojas y tallo, siguiendo la

metodología descrita por Banguero et al. (2015), con las adaptaciones necesarias para las condiciones experimentales planteadas.

- a) **Porcentaje de biomasa en hojas, tallo y raíz:** Durante el proceso de colecta, se extrajeron las raíces del sustrato mediante la inmersión de la planta en agua para separar cuidadosamente la tierra. A continuación, el tallo fue cortado de la raíz. La raíz fue medida para registrar su longitud total y la longitud de la raíz principal, además de su diámetro basal con un pie de rey. Su volumen se determinó por desplazamiento de agua en una probeta de 100 mL llenada hasta los 80 mL. Posteriormente, la raíz se pesó en fresco y se llevó a liofilización para obtener su peso seco, y finalmente, se almacenó a -80°C para análisis bioquímicos. Por su parte, las hojas (tras la obtención de discos) fueron secados en una estufa a 70°C durante 48 horas para finalmente registrar su peso seco, lo que permitió encontrar el porcentaje de biomasa en hojas, tallo y raíz.
- b) **Área foliar:** El área foliar de las plantas fue estimado utilizando la fórmula general para hojas: $\text{Área foliar (cm}^2\text{)} = \text{Longitud (L)} \times \text{Ancho máximo (A)} \times k$, donde L es la longitud de la hoja (desde la base hasta el ápice, sin incluir el pecíolo), A es el ancho máximo de la hoja, y k es un coeficiente de forma. Este método, ampliamente empleado en cacao y otras especies del género *Theobroma*, ha demostrado ser una alternativa confiable para la estimación no destructiva del área foliar (Salazar et al., 2018).

El valor de k se determinó empíricamente a partir de una muestra representativa de hojas, cuyos contornos fueron digitalizados mediante escaneo y analizados con el software ImageJ, una herramienta validada para el análisis de superficies biológicas y ampliamente utilizada en estudios de fisiología vegetal (Schneider et al., 2012). A partir de estos datos, se calculó k como la relación entre el área medida y el producto $L \times A$ para cada hoja, y

posteriormente se estimó un valor promedio que fue utilizado en la fórmula general (**Apéndice 1 y 2**). Este procedimiento permitió obtener un factor de corrección ajustado a la morfología específica de las hojas de copoazú, siguiendo el principio metodológico de calibración empleado para especies del género *Theobroma* (Salazar et al., 2018).

3.5 Análisis de suelo

El análisis fisicoquímico del suelo (**Apéndice 16**) se realizó con el propósito de evaluar los cambios en sus propiedades como respuesta a la aplicación de los diferentes tratamientos. Para ello, las muestras se recolectaron a una profundidad de 0–20 cm en puntos representativos de cada unidad experimental. Posteriormente, las determinaciones analíticas se efectuaron en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales (LQCI) de la Universidad Industrial de Santander, utilizando metodologías estandarizadas para la caracterización de las propiedades químicas del suelo (López et al., 2002; Sparks., 1996).

Se determinaron los macronutrientes nitrógeno total (N), fósforo disponible (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg), así como los micronutrientes hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn), boro (B) y zinc (Zn). Adicionalmente, se cuantificaron el carbono orgánico mediante el método colorimétrico de Walkley-Black y el fósforo disponible mediante el método Bray II. Los contenidos de sodio (Na), aluminio (Al) y azufre (S) se determinaron mediante técnicas de absorción atómica, extracción con DTPA, extracción con KCl y métodos turbidimétricos, según correspondiera. Asimismo, se evaluaron el pH, la conductividad eléctrica (CE), la textura y la capacidad de intercambio catiónico (CIC), con el fin de caracterizar las propiedades fisicoquímicas del suelo y evaluar su respuesta a los tratamientos aplicados (López et al., 2002; Sparks., 1996).

Este análisis permitió complementar la evaluación de la respuesta de las plantas mediante la caracterización de las propiedades fisicoquímicas del suelo asociadas a cada tratamiento, facilitando la interpretación de la relación suelo-planta y de su influencia sobre el crecimiento y desarrollo del copoazú.

3.6 Análisis bioquímico de compuestos funcionales en tejido vegetal

Con el propósito de evaluar el efecto de los tratamientos sobre la respuesta fisiológica y el metabólica de las plantas, se realizó un análisis bioquímico de hojas y raíces al finalizar el experimento. Para esto, se tomaron discos foliares de 1.5 cm de diámetro y muestras de raíces. Para asegurar una representación adecuada de la actividad metabólica general del órgano, las muestras para los análisis bioquímicos se obtuvieron a partir de una mezcla de discos foliares tomados de las secciones basal, central y apical de la lámina foliar. Esta aproximación permite maximizar el rendimiento analítico con el material biológico disponible y obtener un perfil bioquímico promedio de la hoja, lo cual es esencial para determinar las diferencias entre los tratamientos. Una vez colectadas las muestras, se colocaron en sobres de aluminio, y se sumergieron en nitrógeno líquido para su correcta conservación y se almacenaron a -80 °C en un ultracongelador (Thermo Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) hasta su posterior análisis. Específicamente, se cuantificaron clorofilas, carotenoides, compuestos fenólicos, proteínas solubles, flavonoides y azúcares totales, empleando técnicas espectrofotométricas y protocolos estandarizados que incluyen curvas de calibración y medición de absorbancia.

Los análisis de los parámetros bioquímicos se realizaron a partir de diferentes procedimientos de extracción, según la biomolécula de interés. Las extracciones se clasificaron en cuatro grupos: (i) extracción con metanol al 80% (v/v), empleada para la determinación de fenoles totales y flavonoides; (ii) extracción acuosa, utilizada para la cuantificación de azúcares

totales; (iii) extracción con acetona al 80% (v/v), destinada al análisis de clorofilas y carotenoides; y (iv) extracción con buffer Tris-HCl, empleada para la determinación de proteínas totales. Los procedimientos de extracción, así como los protocolos de cuantificación correspondientes para cada biomolécula, se describen a continuación:

- a) **Clorofilas y carotenoides:** La determinación de clorofilas y carotenoides se realizó siguiendo el método descrito por Lichtenthaler (1987), con adaptaciones a las condiciones experimentales del presente estudio. Para la extracción de los pigmentos, 2 discos foliares se homogenizaron en 3 mL de acetona al 80% (v/v) en condiciones de baja luminosidad, con el fin de minimizar su degradación. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El residuo vegetal se sometió a una segunda extracción mediante la adición de 2 mL de acetona al 80% (v/v), recuperándose el sobrenadante obtenido para su lectura en espectrofotómetro de luz visible GENESYS™ 140 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU) a 470 nm, 646 nm y 663 nm. Las concentraciones de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides totales se calcularon utilizando las ecuaciones propuestas por Lichtenthaler (1987) (Ecuaciones 1–4):

$$\text{Clorofila } a \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 12,25 (A_{663}) - 2,79 (A_{646})$$

$$\text{Clorofila } b \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 21,50 (A_{646}) - 5,10 (A_{663})$$

$$\text{Clorofila } a + b \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 7,15 (A_{663}) + 18,71 (A_{646})$$

$$\text{Clorofilas} + \text{Carotenoides} \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{1000 (A_{470}) - 1,82 (C_{\alpha}) - 85,02 (C_{\beta})}{198}$$

- b) **Fenoles totales:** La determinación de fenoles totales se realizó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, basado en la capacidad reductora de los compuestos fenólicos frente a los complejos de fosfomolibdato y fosfotungstato presentes en el reactivo. Esta reacción genera una coloración azul cuya intensidad, medida espectrofotométricamente. El procedimiento se siguió de acuerdo con lo descrito por Singleton & Rossi (1965), con algunas modificaciones. Brevemente, se emplearon 200 μL del extracto metanólico al 80% (v/v), preparado a partir de 50 mg de tejido foliar (equivalentes a cuatro discos foliares) o 100 mg de tejido radical, los cuales se mezclaron con 1800 μL de agua destilada y 200 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se homogenizó mediante vórtex y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 2 mL de Na_2CO_3 al 7% (p/v) y 800 μL de agua destilada, seguida de homogenización en vortex e incubación durante 90 minutos en oscuridad. La absorbancia se registró en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) a 750 nm. Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico como estándar, preparando soluciones de concentración conocida (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 $\mu\text{g/mL}$), y los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico (pureza >98%, Merck) por gramo de peso fresco (mg EAG/g PF), de acuerdo con lo establecido por Ainsworth & Gillespie (2007).
- c) **Proteínas totales:** Las proteínas totales en el material vegetal (hojas y raíces) fueron extraídas por un método de lisis química que consta de adición de dodecil sulfato de sodio (SDS), dithiotretitol (DTT) en un buffer Tris-HCl (Li & Keller., 2023). En detalle, se pesaron aproximadamente 100 mg de material vegetal fresco de copoazú y se maceraron con 2 mL de solución de lisis (100 mM Tris-HCl pH 6.9 con 4% de SDS y 50

mM de DTT), una vez la muestra estuvo homogenizada, fue transferida a un tubo cónico de 5 mL y se dispuso en un baño ultrasónico en el sonicador modelo E15H (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Alemania) a 65°C durante 30 minutos con el fin de extraer tanto proteínas extracelulares como intracelulares. Una vez concluido el proceso de lisis, se adicionó 1 mL de una solución fría de TCA al 10% (p/v) en acetona para inducir la precipitación de proteínas (Mikulášek, K., et al, 2021). Una vez formado el pellet de proteínas, fueron purificadas por lavados sucesivos con acetona fría mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min, hasta que el pellet tomó una coloración blanca. Finalmente, las proteínas fueron resuspendidas en buffer Tris-HCl 50 mM a pH 8.6 para su posterior cuantificación mediante el método de ácido bicinónico (BCA) empleando un kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, 2020) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

De manera resumida, se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) a diferentes concentraciones (0, 5, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 1900 µg/mL). Seguidamente, las muestras fueron incubadas con el reactivo de trabajo del kit de BCA a 37 °C por 30 min. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 562 nm en lector de microplacas (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, EE. UU). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante la interpolación en la curva estándar, incluyendo blancos y controles de recuperación para validar la precisión del método.

- d) **Flavonoides:** La cuantificación de flavonoides totales se realizó mediante el método colorimétrico basado en la formación de complejos con cloruro de aluminio (AlCl_3). Este método se fundamenta en la capacidad de los iones Al^{3+} para formar complejos con

determinados grupos funcionales presentes en la estructura de los flavonoides, principalmente grupos carbonilo y grupos hidroxilo capaces de actuar como sitios de coordinación. La formación de estos complejos produce una coloración característica cuya intensidad puede determinarse espectrofotométricamente y se relaciona con el contenido de flavonoides de la muestra. Para la extracción de los compuestos, se empleó metanol al 80 % (v/v) como solvente.

El procedimiento se realizó de acuerdo con la metodología descrita originalmente por Zhishen et al. (1999), con modificaciones en los volúmenes de reactivos adaptadas a las condiciones experimentales del presente estudio, y considerando las adaptaciones aplicadas en otros trabajos similares (Chang et al., 2002).

Se tomaron 0,5 mL del extracto metanólico al 80% (v/v) obtenido a partir de 50 mg de tejido foliar, equivalentes a cuatro discos foliares, o 100 mg de tejido radicular. A cada alícuota se adicionaron 150 μ L de NaNO_2 al 5% (p/v). Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 150 μ L de AlCl_3 al 10% (p/v). Transcurridos 6 minutos de reacción, se incorporó 1 mL de NaOH 1 M y el volumen se ajustó a 5 mL con agua destilada. Posteriormente, la mezcla se homogenizó y la absorbancia se determinó a 510 nm utilizando un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón).

Para la curva de calibración se empleó catequina como estándar, utilizando concentraciones de: 0; 0,020; 0,040; 0,060; 0,080; 0,100; 0,120 mg/mL. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de catequina por gramo de peso fresco (mg EC/g PF). La catequina utilizada presentó una pureza superior al 98 % (Merck).

e) **Azúcares totales:** La determinación de azúcares totales se realizó mediante el método colorimétrico de antrona, de acuerdo lo descrito por Yemm & Willis (1954). Para ello, se mezclaron 0,5 mL del extracto acuoso con 2,5 mL del reactivo de antrona, preparado a partir de antrona (97%; Sigma-Aldrich) disuelta en ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). La mezcla se homogenizó mediante agitación en vórtex y se mantuvo refrigerada hasta su procesamiento. Posteriormente, se incubó a 100 °C durante 10 minutos. Una vez enfriada a temperatura ambiente, la absorbancia se midió a 620 nm utilizando un lector de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, EE. UU.). La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración elaborada con glucosa ($\geq 99,5\%$; Sigma-Aldrich) empleando concentraciones de 0, 20, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados de los análisis bioquímicos se expresaron como miligramos equivalentes del estándar correspondiente por gramo de peso fresco (mg E/g PF) para las muestras de hojas y como miligramos equivalentes del estándar correspondiente por gramo de peso seco (mg E/g PS) para las muestras de raíces. Todos los análisis bioquímicos descritos anteriormente se realizaron por duplicado.

Estos análisis permitieron correlacionar la actividad bioestimulante de los tratamientos con respuestas fisiológicas clave, relacionadas con la fotosíntesis, el metabolismo secundario y la acumulación de reservas energéticas.

3.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante Microsoft Excel 2016 y Python 3.12. Para el procesamiento, análisis y representación gráfica de los datos se emplearon las bibliotecas empleando las bibliotecas *NumPy*, *Pandas*, *SciPy*, *Matplotlib* y *Seaborn*. Los

resultados se reportaron como media aritmética $\pm$ error estándar (EE), mientras que las barras de error mostradas en las figuras corresponden al error estándar de las mediciones.

Previamente a los análisis inferenciales, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene, respectivamente, de acuerdo con los criterios establecidos por Ghasemi & Zahediasl (2012). En el caso de las variables analizadas mediante diseños multifactoriales, se verificó adicionalmente la homogeneidad de las matrices de varianza-covarianza mediante la prueba M de Box.

La selección de las pruebas estadísticas se realizó en función del cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para las variables bioquímicas determinadas en hojas y raíces (proteínas, carbohidratos, fenoles y flavonoides), se empleó un análisis de varianza mixto (Mixed ANOVA) cuando se cumplieron los supuestos paramétricos. Cuando estos no se cumplieron, se utilizó el análisis de varianza no paramétrico mediante transformación de rangos alineados (Aligned Rank Transform ANOVA, ART ANOVA), siguiendo la metodología propuesta por Wobbrock et al. (2011). En las variables morfológicas, de biomasa y de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides), se aplicó el ANOVA de Welch cuando se presentó heterogeneidad de varianzas, manteniendo el supuesto de normalidad. En aquellos casos en los que no se cumplió este último supuesto, se utilizó la prueba de Kruskal–Wallis.

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante las pruebas t de Welch, prueba de Mann–Whitney, prueba t pareada o prueba de rangos con signo de Wilcoxon, según las características de los datos y el cumplimiento de los supuestos estadísticos. Para todas las pruebas se estableció un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Adicionalmente, se realizaron análisis exploratorios para identificar patrones globales de respuesta entre tratamientos. Para ello, se construyeron diagramas de caja y bigotes (Box-plot), mapas de calor basados en cambios relativos respecto a los controles y se evaluaron las asociaciones entre variables mediante correlaciones de Spearman. Las relaciones con coeficientes absolutos de correlación superiores a 0,7 ($|p| > 0,7$) se utilizaron para construir una matriz de adyacencia y una red de correlaciones, permitiendo identificar grupos de variables con respuestas coordinadas, determinar la dirección de las asociaciones y establecer el grado de centralidad de cada variable dentro del sistema evaluado.

Los **Apéndices 21** al **26** presentan las tablas correspondientes a los análisis de varianza (ANOVA), en las cuales se incluyen los valores de significancia estadística asociados con los efectos de los tratamientos sobre las diferentes variables evaluadas. Estas tablas constituyen el respaldo estadístico de los resultados presentados en el documento.

4 Resultados

En esta sección se presentan los resultados obtenidos durante la etapa experimental, en la que se evaluó el efecto de la pulpa de café como bioestimulante en plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*), considerando diferentes dosis de aplicación y condiciones lumínicas. Los resultados se presentan en cinco apartados: caracterización fisicoquímica del sustrato, respuestas morfológicas y de biomasa, contenido de pigmentos fotosintéticos, metabolitos primarios y secundarios, y análisis multivariado de las variables evaluadas.

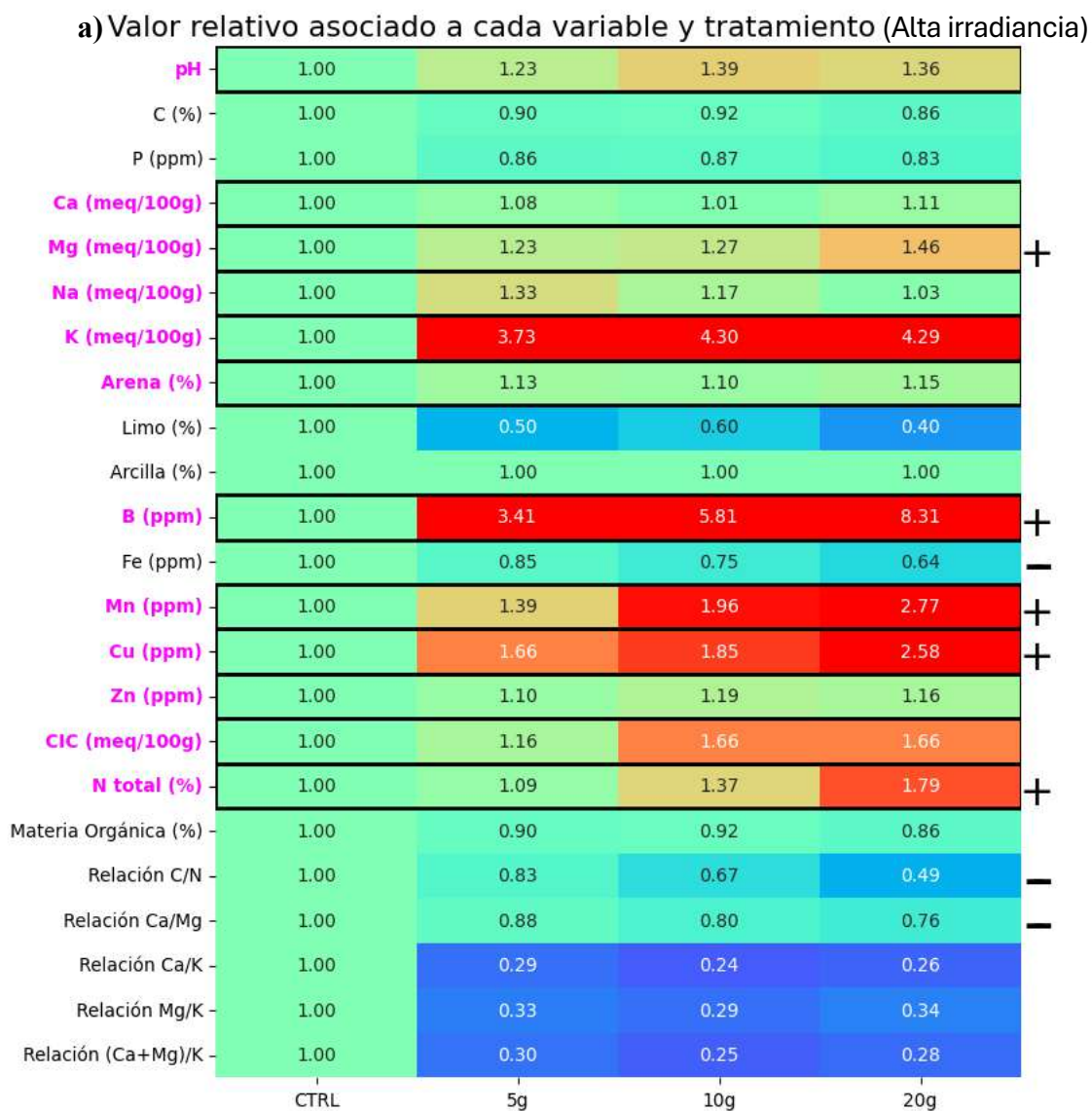
4.1 Caracterización fisicoquímica del sustrato

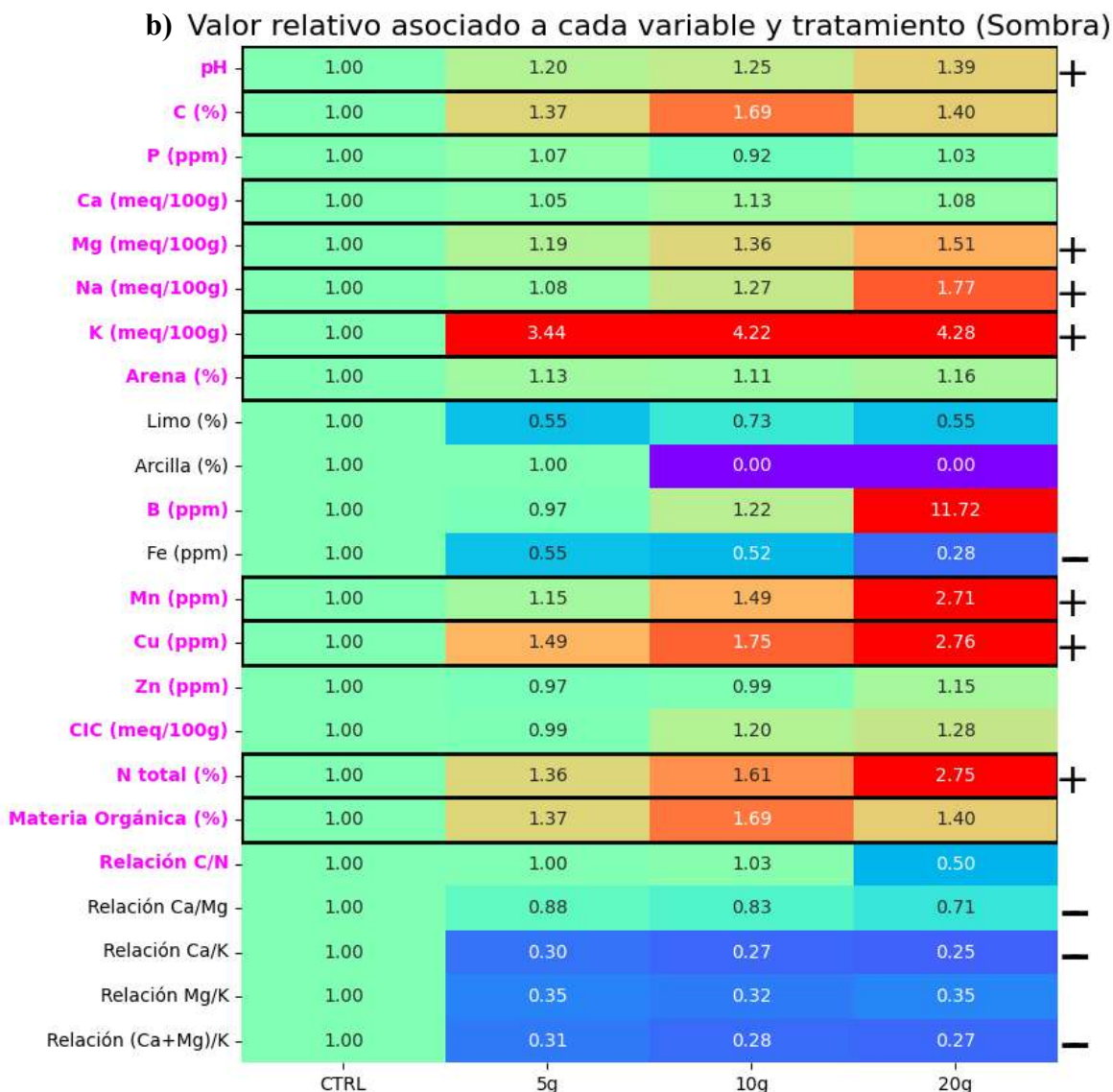
La caracterización fisicoquímica del sustrato permitió determinar los cambios asociados con la aplicación de pulpa de café sobre sus propiedades químicas al finalizar el ciclo

experimental. Para cada tratamiento se obtuvo una muestra compuesta a partir de la mezcla del sustrato recolectado de las seis unidades experimentales correspondientes. En total, se analizaron ocho muestras compuestas, correspondientes a los tratamientos control, 5, 10 y 20 g de pulpa de café, bajo condiciones de alta irradiancia y sombra. Los valores absolutos obtenidos mediante los análisis fisicoquímicos realizados por el Laboratorio Químico de Consultas Industriales (LQCI) se presentan en el **Apéndice 16**. Para facilitar la comparación entre tratamientos y visualizar los cambios relativos respecto a los controles, los datos fueron normalizados y representados mediante mapas de calor en la **Figura 12**, correspondientes a las dos condiciones de cultivo evaluadas.

Figura 12.

Mapa de calor de las variables fisicoquímicas del suelo normalizadas respecto al control bajo condiciones de luz solar directa y bajo sombra al 65%





Nota. El mapa de calor ilustra la reconfiguración del ambiente edáfico inducida por la pulpa de café. La intensidad del color refleja el valor relativo de cada variable respecto al control: los valores positivos se representan mediante una gradiente de verde a rojo, donde el rojo indica los mayores incrementos; los valores negativos se representan mediante una gradiente de verde a azul, donde el azul indica las mayores disminuciones; y el color verde corresponde a un valor relativo igual o cercano a cero, equivalente a una respuesta similar a la del control. Y

Los recuadros negros señalan las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento control.

La **Figura 12a** muestra que, bajo condiciones de luz solar directa, la incorporación de pulpa de café promovió un incremento generalizado de variables químicas asociadas con la fertilidad del sustrato. Estos cambios se reflejaron en los valores absolutos del **Apéndice 16**, donde el contenido de potasio aumentó de 1,08 a 4,64 meq/100 g en la dosis de 10 g y a 4,63 meq/100 g en 20 g; el boro pasó de 0,32 a 1,86 y 2,66 ppm, respectivamente; el manganeso aumentó de 5,85 a 11,48 y 16,23 ppm; el cobre de 0,65 a 1,20 y 1,68 ppm; el magnesio de 1,73 a 2,19 y 2,52 meq/100 g y el nitrógeno total de 0,43 a 0,59 y 0,77 %. De igual forma, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) aumentó de 17,6 a 29,2 meq/100 g en ambas dosis. En contraste, variables como el hierro, la materia orgánica, el porcentaje de limo y las relaciones C/N, Ca/Mg, Ca/K, Mg/K y (Ca+Mg)/K presentaron una disminución respecto al control, comportamiento que también se evidencia en el mapa de calor mediante los valores relativos inferiores a la unidad.

Bajo condiciones de sombra (**Figura 12b**), la respuesta del sustrato presentó un patrón parcialmente diferente. Se observaron incrementos progresivos en el pH (de 5,6 a 7,8), el potasio (de 1,09 a 4,67 meq/100 g), el magnesio (de 1,76 a 2,66 meq/100 g) y el sodio (de 0,26 a 0,46 meq/100 g) conforme aumentó la dosis de pulpa de café. Asimismo, el boro, manganeso, cobre y nitrógeno total alcanzaron sus mayores valores en la dosis de 20 g, incrementándose de 0,32 a 3,75 ppm, 7,37 a 19,98 ppm, 0,59 a 1,63 ppm y 0,36 a 0,99 %, respectivamente. A diferencia del régimen de luz, el mayor contenido de carbono (5,04 %) y de materia orgánica (8,69 %) se registró con la dosis de 10 g, lo que coincide con los mayores valores relativos observados en el mapa de calor. En contraste, el contenido de hierro disminuyó de 50,64 a 14,12 ppm, mientras que las relaciones Ca/Mg, Ca/K, Mg/K y (Ca+Mg)/K también presentaron reducciones

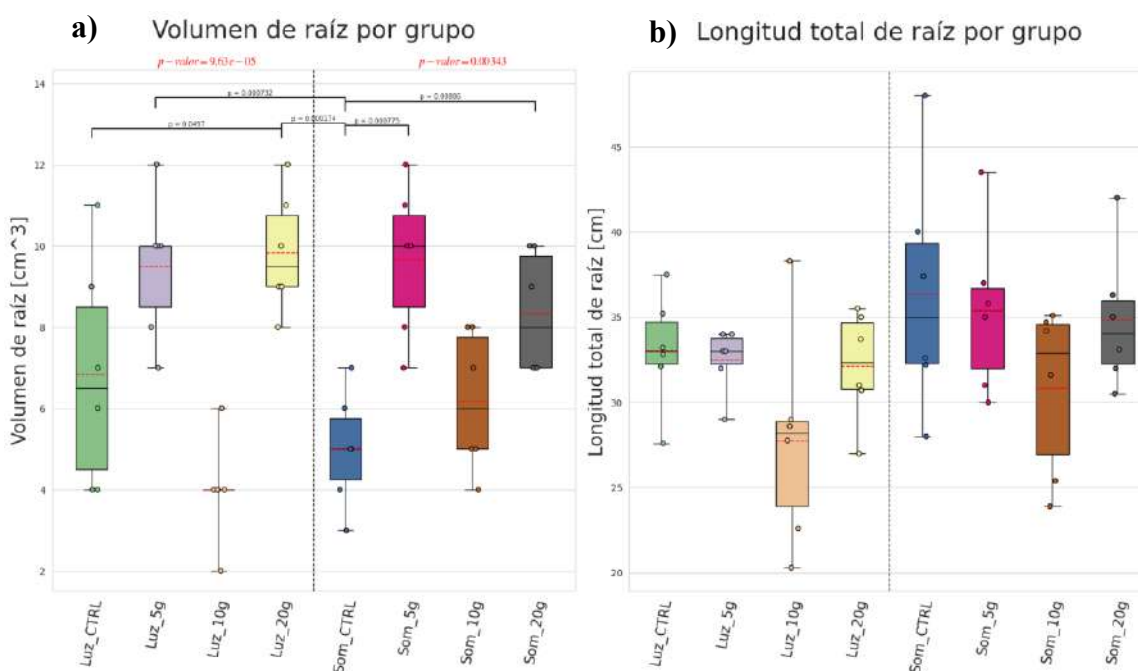
progresivas respecto al control, reflejando una modificación del equilibrio catiónico del sustrato tras la incorporación de la pulpa de café.

4.2 Respuesta morfológica y acumulación de biomasa

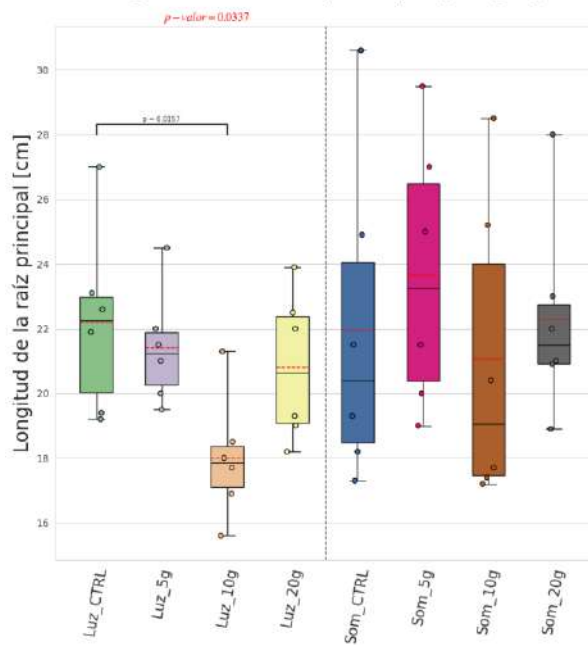
La evaluación de las variables morfológicas y de biomasa permitió determinar el efecto de la aplicación de pulpa de café sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de copoazú. En primer lugar, se presentan los resultados correspondientes a la cosecha destructiva, que comprenden variables relacionadas con el desarrollo estructural de las plantas y la acumulación de biomasa. Posteriormente, se muestran las variables de crecimiento monitoreadas durante el desarrollo del experimento. Los resultados se presentan mediante diagramas de caja y bigotes y mapas de calor, facilitando la comparación entre tratamientos y la identificación de patrones de respuesta bajo las condiciones experimentales evaluadas.

Figura 13.

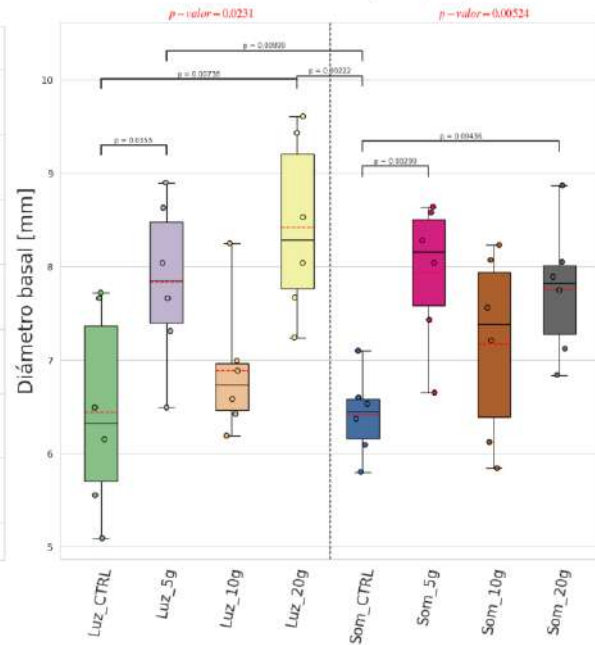
Comportamiento de las variables de biomasa en plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café.



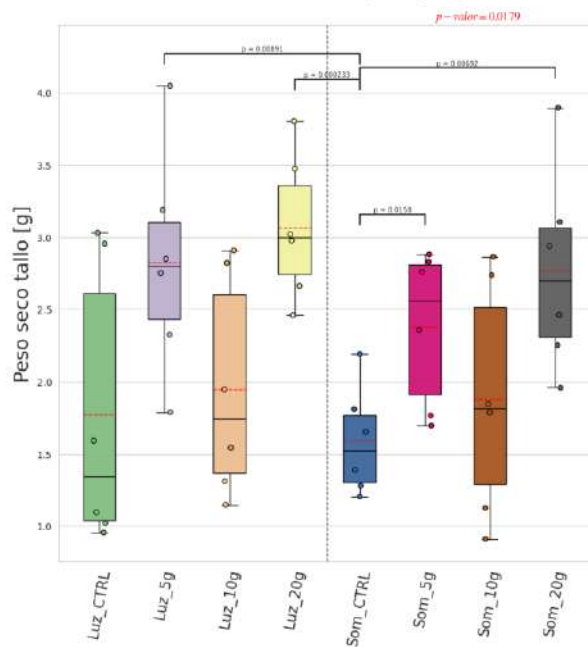
c) Longitud de la raíz principal por grupo



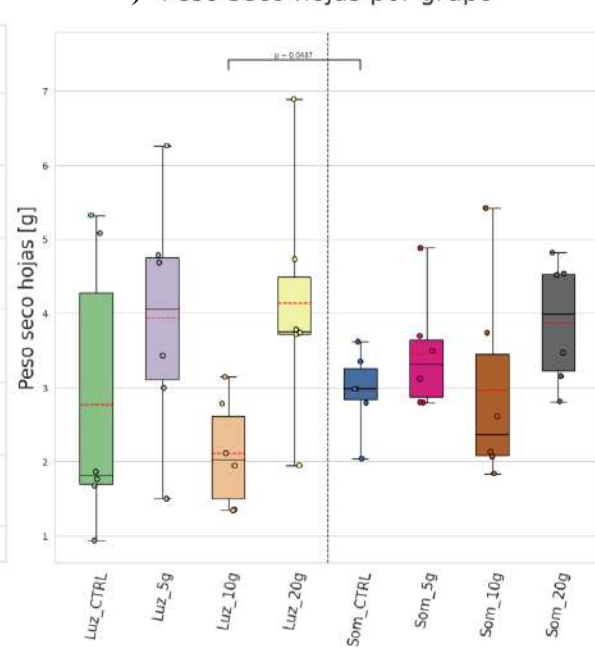
d) Diámetro basal por grupo

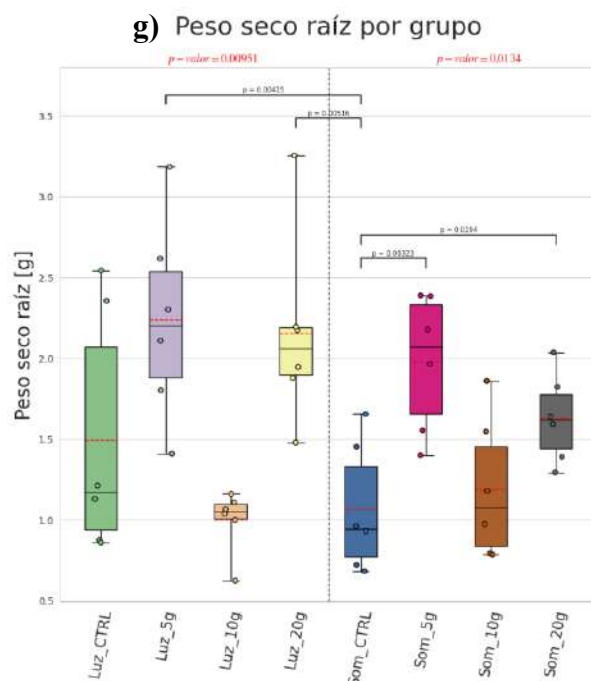


e) Peso seco tallo por grupo



f) Peso seco hojas por grupo





Nota. Los diagramas de caja y bigotes muestran la distribución de las variables asociadas con la biomasa y el crecimiento radicular en los diferentes tratamientos. La línea central de cada caja representa la mediana, mientras que la caja comprende el rango intercuartílico (Q1–Q3); los bigotes indican la dispersión de los datos y los puntos individuales corresponden a las observaciones experimentales. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante pruebas de significancia estadística y, en los casos en que se identificaron diferencias significativas ($p < 0,05$), los valores de p se indican en la figura.

La **Figura 13** presenta la respuesta de las variables de crecimiento radicular y acumulación de biomasa de las plántulas de copoazú frente a la aplicación de diferentes dosis de pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra. En relación con el desarrollo radicular, el volumen de raíz (**Figura 13a**) presentó diferencias significativas tanto en luz ($p = 9,63 \times 10^{-5}$) como en sombra ($p = 0,00343$), observándose un patrón consistente en ambos tratamientos. Bajo luz, el volumen aumentó de $6,83 \pm 1,14 \text{ cm}^3$ en el control a $9,50 \pm 0,72 \text{ cm}^3$ y $9,83 \pm 0,60 \text{ cm}^3$ en las dosis de 5 g y 20 g, respectivamente, mientras que el tratamiento de 10 g registró el menor

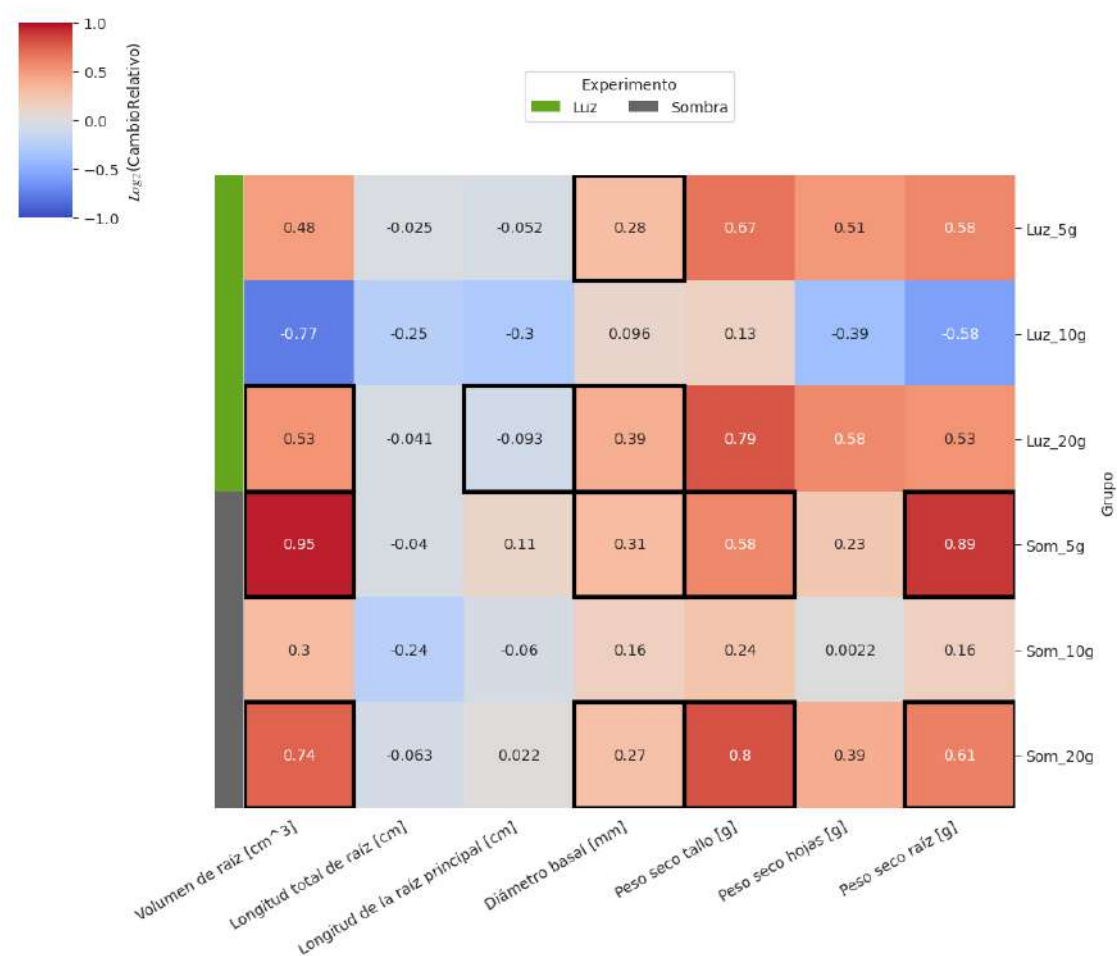
valor ($4,00 \pm 0,63 \text{ cm}^3$). Bajo sombra se observó una tendencia similar, destacándose nuevamente la dosis de 5 g ($9,67 \pm 0,76 \text{ cm}^3$). En contraste, la longitud total de la raíz (**Figura 13b**) no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$), aunque mostró una ligera tendencia a disminuir con la dosis de 10 g. De manera similar, la longitud de la raíz principal (**Figura 13c**) solo difirió bajo condiciones de luz ($p = 0,0337$), donde el tratamiento de 10 g redujo su longitud promedio de $22,20 \pm 1,17 \text{ cm}$ en el control a $18,00 \pm 0,95 \text{ cm}$.

El diámetro basal (**Figura 13d**) presentó diferencias significativas tanto en luz ($p = 0,0231$) como en sombra ($p = 0,00524$), confirmando la tendencia observada para el crecimiento radicular, con una respuesta más favorable en las dosis de 5 g y 20 g. En conjunto, estos resultados indican que la respuesta morfológica dependió de la dosis aplicada, siendo el tratamiento de 10 g el que presentó el comportamiento menos favorable.

Respecto a la acumulación de biomasa, el peso seco del tallo (**Figura 13e**) mostró diferencias significativas únicamente bajo sombra ($p = 0,0179$), donde la dosis de 5 g alcanzó $2,38 \pm 0,22 \text{ g}$, superando al control ($1,59 \pm 0,15 \text{ g}$) y al tratamiento de 10 g ($1,88 \pm 0,33 \text{ g}$). El peso seco de las hojas (**Figura 13f**) no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$), mientras que el peso seco de la raíz (**Figura 13g**) solo difirió bajo sombra ($p = 0,0134$), registrando la dosis de 5 g el mayor valor ($1,98 \pm 0,17 \text{ g}$) frente al control ($1,07 \pm 0,16 \text{ g}$). En general, las dosis de 5 g y 20 g favorecieron el crecimiento y la acumulación de biomasa, mientras que el tratamiento con 10 g mostró la respuesta menos favorable.

Figura 14.

Mapa de calor de los cambios relativos de las variables morfológicas y de biomasa en plántulas de copoazú



Nota. El mapa de calor muestra la respuesta relativa de las variables morfológicas y de biomasa respecto al control para cada tratamiento y condición lumínica. Los tonos rojos indican respuestas positivas o mayores valores relativos, mientras que los tonos azules representan respuestas negativas o menores valores relativos; la intensidad del color refleja la magnitud del efecto. Los recuadros negros indican las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

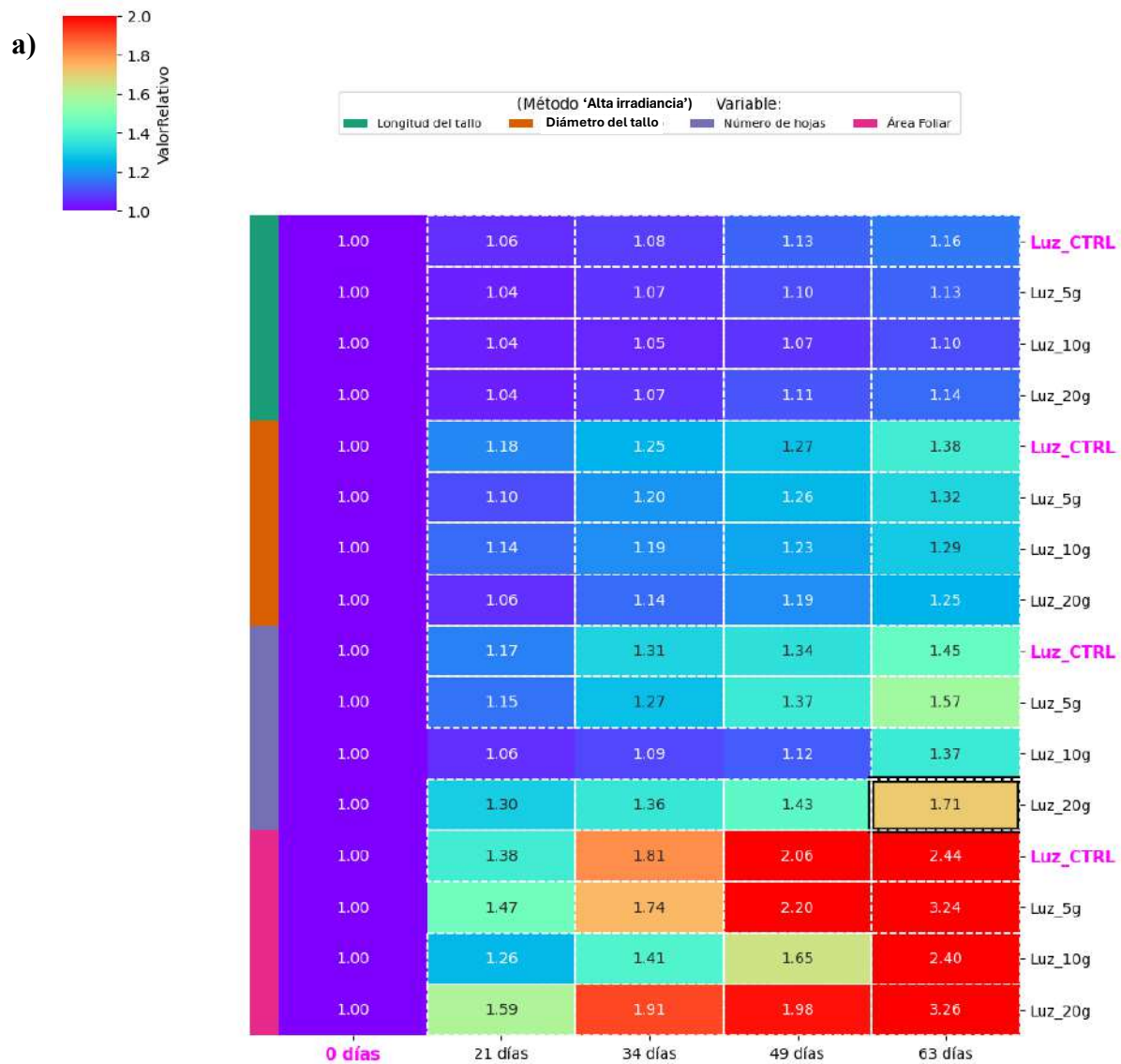
La **Figura 14** sintetiza la respuesta relativa de las variables morfológicas y de biomasa respecto a sus respectivos controles, permitiendo visualizar de manera integrada el efecto de las diferentes dosis de pulpa de café bajo ambos regímenes lumínicos. En términos generales, las dosis de 5 g y 20 g presentaron las respuestas más favorables, con incrementos relativos

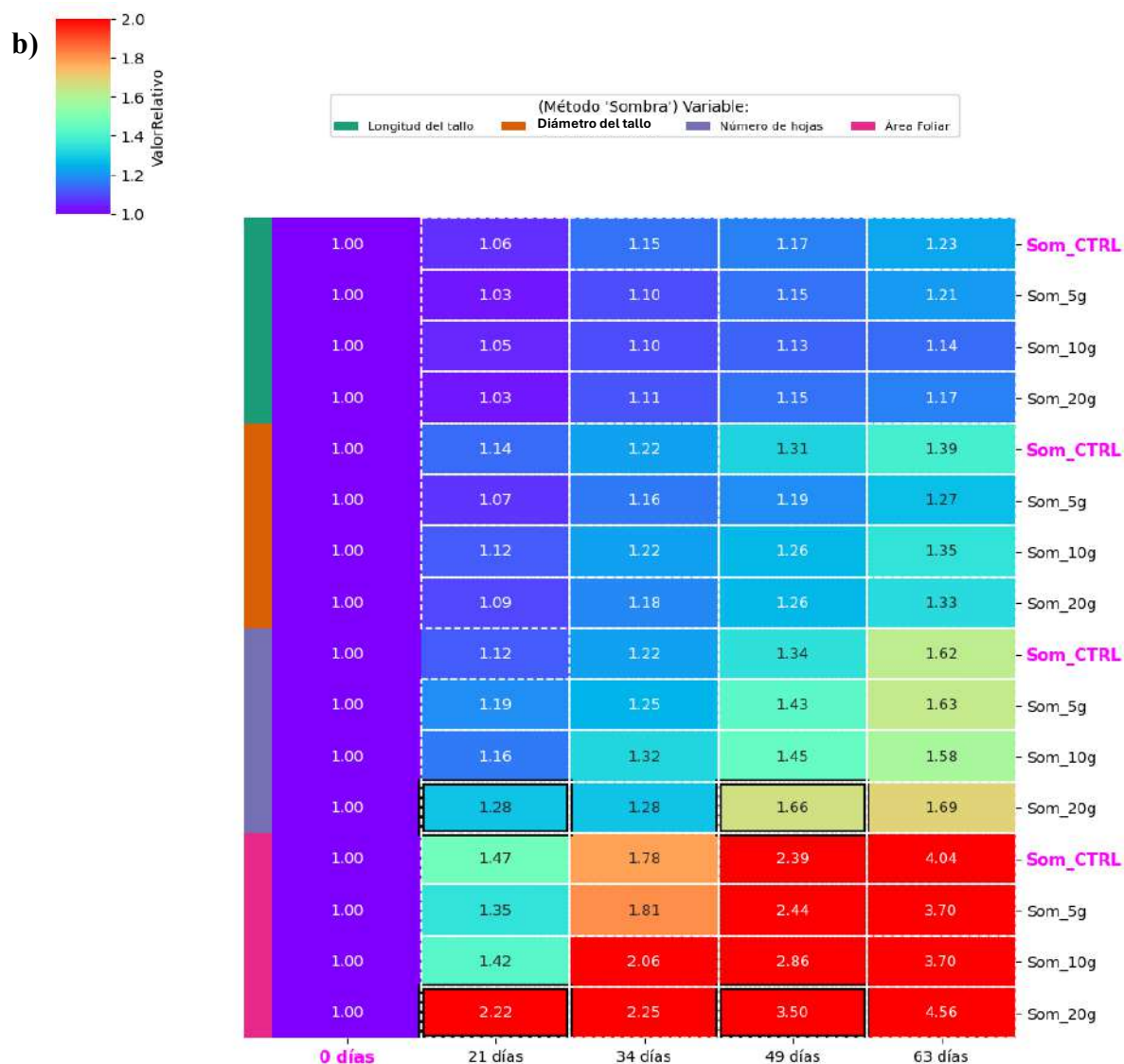
principalmente en el volumen de raíz, el diámetro basal y las variables de biomasa. En contraste, el tratamiento de 10 g mostró predominantemente respuestas negativas o de menor magnitud, especialmente bajo condiciones de luz. En conjunto, este comportamiento confirma las tendencias observadas previamente en la **Figura 13**.

Estas tendencias también fueron respaldadas por el análisis de componentes principales (PCA) presentado en los **Apéndices 17 y 18**, el cual permitió evaluar la respuesta conjunta de las variables morfológicas y de biomasa bajo ambos regímenes lumínicos. En condición de luz (**Apéndice 17**), los dos primeros componentes principales explicaron el 81,11 % de la variación total y evidenciaron una diferenciación parcial entre los tratamientos, donde las dosis de 5 g y 20 g tendieron a agruparse hacia valores positivos del segundo componente (PC2), mientras que el tratamiento de 10 g y el control se ubicaron principalmente hacia valores negativos. Bajo condición de sombra (**Apéndice 18**), los dos primeros componentes explicaron el 93,16 % de la variación total y mostraron una separación moderada entre los tratamientos, destacándose la dosis de 5 g por su asociación con valores positivos de PC2. En ambos análisis, las variables con mayor contribución estuvieron relacionadas principalmente con el crecimiento radicular y la acumulación de biomasa, confirmando el patrón observado en las **Figuras 13 y 14**, donde las dosis de 5 g y 20 g presentaron las respuestas más favorables, mientras que el tratamiento con 10 g mostró el comportamiento menos favorable, especialmente bajo condiciones de luz.

Figura 15.

Mapa de calor de variables morfológicas en respuesta a la aplicación de pulpa de café bajo luz solar directa y bajo sombra al 65%





Nota. El mapa de calor ilustra la respuesta relativa de las variables morfológicas de plantas de copoazú sometidas a dos regímenes lumínicos y a diferentes dosis de pulpa de café. Las variables representadas corresponden a longitud del tallo, diámetro del tallo, número de hojas y área foliar, evaluadas en distintos tiempos de medición. Los valores dentro de cada celda indican la magnitud relativa de la respuesta respecto al control, donde valores superiores a 1,0 representan incrementos en comparación con este. La intensidad del color refleja dicha variación relativa: las tonalidades azuladas y moradas indican respuestas de menor magnitud o cercanas al control, mientras que las tonalidades verdes, amarillas, naranjas y rojas representan incrementos

progresivamente mayores. Los recuadros negros señalan las variables y momentos de evaluación que presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

La **Figura 15** presenta la evolución de las variables morfológicas de las plántulas de copoazú durante el periodo experimental, en respuesta a la aplicación de pulpa de café bajo condiciones de alta irradiancia y sombra. En ambas condiciones se observó un incremento progresivo en la longitud y el diámetro del tallo, el número de hojas y el área foliar conforme avanzó el ensayo. Entre estas variables, el área foliar presentó el mayor incremento relativo hacia el final del periodo experimental.

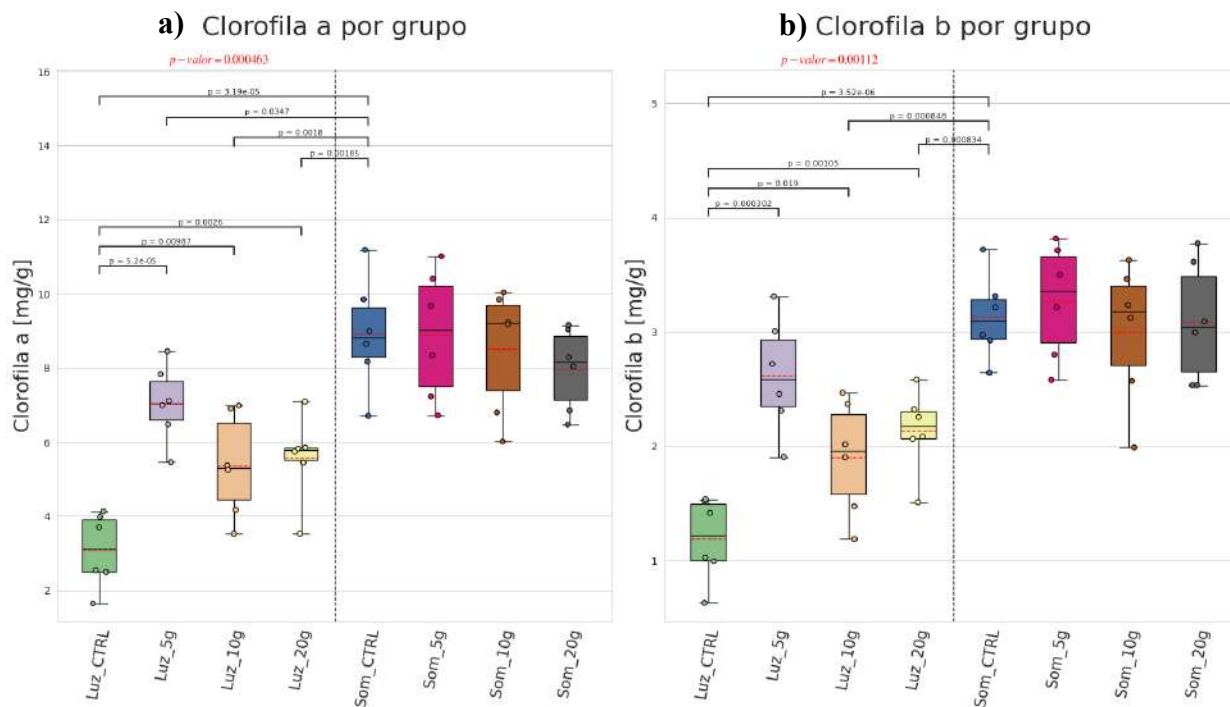
Bajo condiciones de luz (**Figura 15a**), las diferencias significativas se concentraron principalmente en las etapas finales de evaluación. La dosis de 20 g presentó un incremento significativo en el número de hojas, alcanzando un promedio final de $9,83 \pm 0,75$ hojas, superior al control ($7,83 \pm 0,95$ hojas). De igual forma, el área foliar mostró aumentos significativos al finalizar el experimento, destacándose los tratamientos de 5 g y 20 g, con valores de $447,35 \pm 92,73 \text{ cm}^2$ y $485,49 \pm 63,46 \text{ cm}^2$, respectivamente, frente al control ($295,59 \pm 81,34 \text{ cm}^2$). En contraste, bajo condiciones de sombra (**Figura 15b**), las respuestas significativas fueron más frecuentes y se distribuyeron entre diferentes variables. La dosis de 20 g presentó los mayores valores finales de número de hojas ($9,00 \pm 0,52$) y área foliar ($540,49 \pm 41,39 \text{ cm}^2$). En conjunto, estos resultados evidencian una respuesta dependiente tanto de la dosis aplicada como del tratamiento lumínico, con una mayor magnitud de respuesta morfológica bajo condiciones de sombra. Asimismo, el efecto bioestimulante no fue uniforme entre las variables evaluadas, ya que mientras la dosis de 20 g promovió los mayores incrementos en variables de crecimiento como el número de hojas y el área foliar, otras variables morfológicas y fisiológicas presentadas en las siguientes secciones mostraron respuestas favorables con dosis menores.

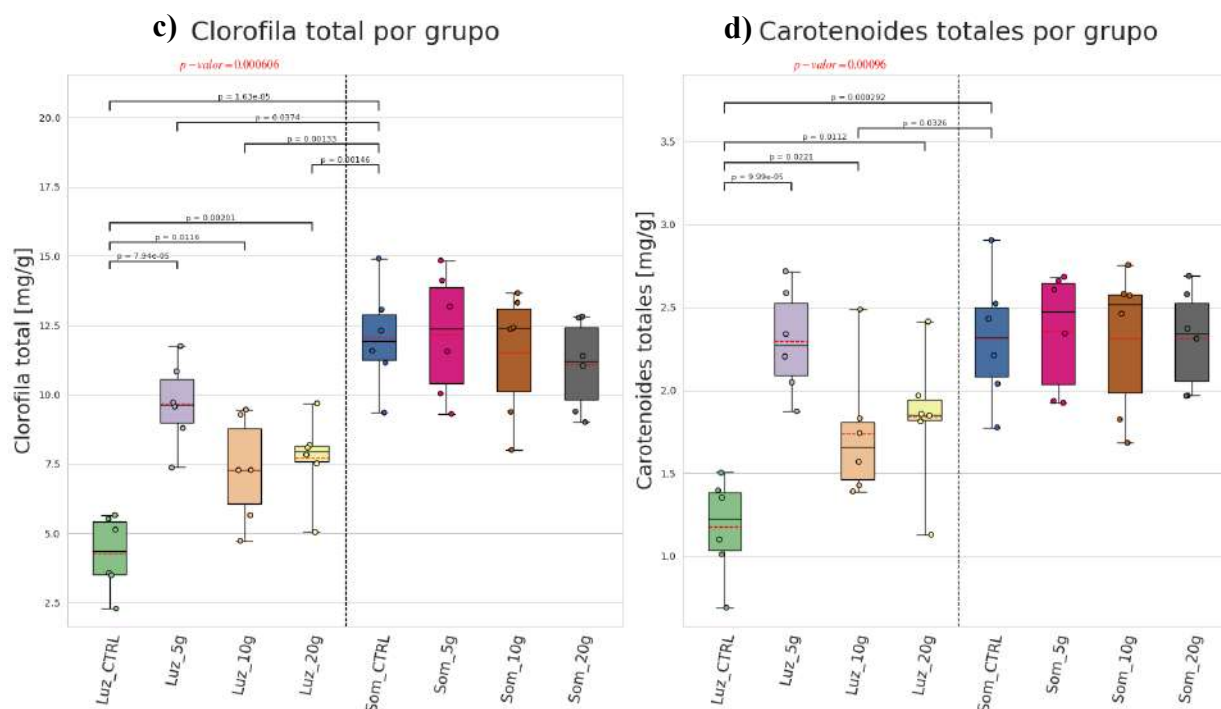
4.3 Contenido de pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos son componentes esenciales del aparato fotosintético y participan en la captación de la energía lumínica necesaria para el desarrollo de las plantas. Con el propósito de evaluar la respuesta de estos pigmentos a la aplicación de pulpa de café bajo las diferentes condiciones de iluminación estudiadas, se determinó el contenido de clorofilas y carotenoides en las plántulas de copoazú. Los resultados obtenidos se presentan mediante diagramas de caja y bigotes, lo que permite comparar la distribución de estas variables entre los tratamientos evaluados.

Figura 16.

Contenido de Clorofilas y Carotenoides en hojas de copoazú tratadas con pulpa de café





Nota. Los diagramas de caja y bigotes muestran la variación en el contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides totales en hojas de copoazú bajo los tratamientos con pulpa de café y dos regímenes lumínicos. La línea vertical punteada separa las plantas mantenidas bajo condiciones de luz de aquellas evaluadas bajo sombra. Las barras superiores indican las comparaciones estadísticas entre tratamientos, con sus respectivos valores de p , donde $p < 0,05$ señala diferencias estadísticamente significativas.

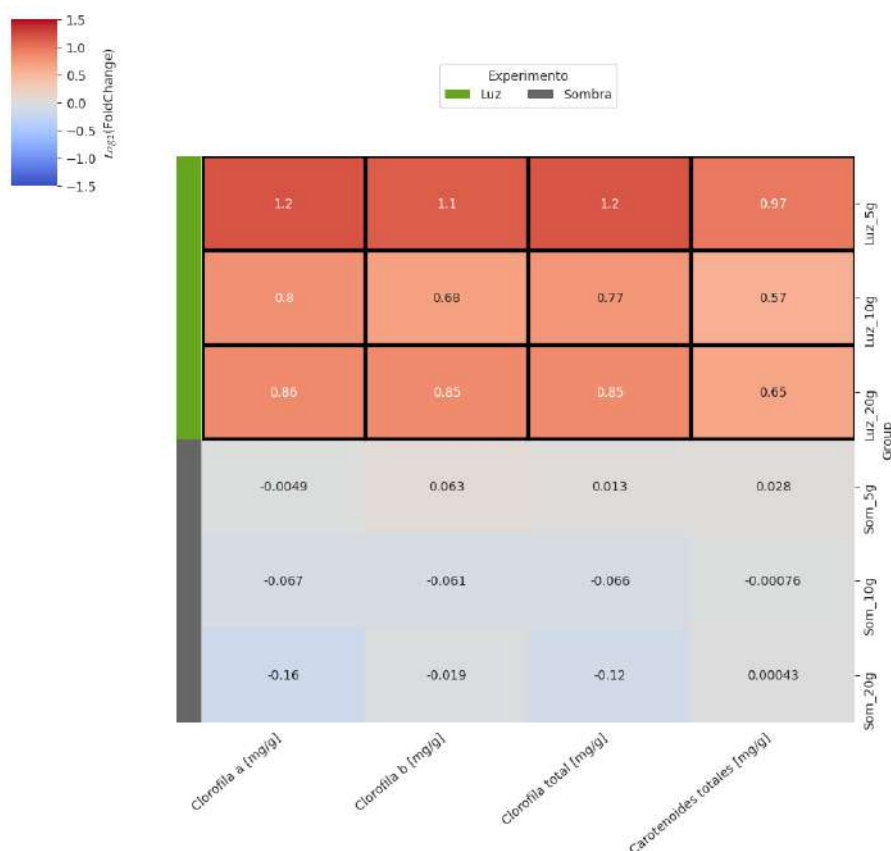
La **Figura 16** muestra el contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides totales en las hojas de plántulas de copoazú sometidas a diferentes dosis de pulpa de café bajo condiciones de alta irradiancia y sombra. En condiciones de alta irradiancia se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para todas las variables evaluadas (clorofila a: $p = 0,000463$; clorofila b: $p = 0,00112$; clorofila total: $p = 0,000606$; carotenoides totales: $p = 0,00096$). En contraste, bajo condiciones de sombra no se

observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$). Los valores promedio $\pm$ error estándar correspondientes a cada tratamiento se presentan en el **Apéndice 11**.

Bajo condiciones de luz, las **Figuras 16a–16d** muestran que el tratamiento con 5 g presentó los mayores contenidos de pigmentos fotosintéticos respecto al control, alcanzando $2,01 \pm 0,16$ mg/gPF de clorofila a, $0,75 \pm 0,08$ mg/gPF de clorofila b, $2,76 \pm 0,24$ mg/gPF de clorofilas totales y $0,65 \pm 0,05$ mg/gPF de carotenoides totales, frente al control. Por el contrario, la dosis de 10 g mostró una disminución en el contenido de clorofilas y carotenoides respecto al tratamiento de 5 g, mientras que la dosis de 20 g presentó una recuperación parcial, aunque sin alcanzar los valores máximos observados con la dosis de 5 g. En contraste, bajo condiciones de sombra, los tratamientos mantuvieron valores similares para todas las variables evaluadas, sin diferencias estadísticas entre dosis, lo que sugiere una respuesta más homogénea del contenido de pigmentos fotosintéticos bajo este régimen lumínico.

Figura 17.

Mapa de calor de los cambios relativos de clorofilas y carotenoides



Nota. El mapa de calor muestra la respuesta relativa del contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides totales en plántulas de copoazú sometidas a diferentes dosis de pulpa de café bajo condiciones de alta irradiancia y sombra. Los valores representan la variación relativa de cada tratamiento con respecto al control correspondiente a cada condición lumínica, mientras que la intensidad del color indica la magnitud de la respuesta. Los recuadros negros señalan las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

La **Figura 17** complementa los resultados presentados en la **Figura 16** y muestra que, bajo condiciones de alta irradiancia, la aplicación de pulpa de café produjo un incremento en el

contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides respecto al control. Entre las dosis evaluadas, la aplicación de 5 g presentó la mayor respuesta relativa y diferencias estadísticamente significativas en las cuatro variables analizadas. En contraste, bajo condiciones de sombra las variaciones fueron mínimas y no se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos, confirmando una respuesta más estable del contenido de pigmentos fotosintéticos bajo este régimen lumínico.

Estas tendencias se corroboran mediante el análisis de componentes principales (PCA) presentado en los **Apéndices 19 y 20**, el cual permitió evaluar de forma conjunta la respuesta del contenido de pigmentos fotosintéticos bajo ambos regímenes lumínicos. En condición de luz (**Apéndice 19**), los dos primeros componentes principales explicaron el 100 % de la variación total y evidenciaron una separación parcial entre el control y los tratamientos con pulpa de café, aunque con cierto grado de solapamiento entre los grupos. Los tratamientos bioestimulados tendieron a agruparse hacia valores cercanos o positivos de PC1, mientras que el control mostró una mayor dispersión hacia valores negativos. Por su parte, bajo condición de sombra (**Apéndice 20**), los dos primeros componentes también explicaron el 100 % de la variación total; sin embargo, se observó una mayor superposición entre los tratamientos, con una ligera dispersión a lo largo de PC1, donde las dosis de 5 g y 20 g tendieron a ubicarse hacia valores positivos, mientras que el tratamiento con 10 g presentó una mayor dispersión hacia valores negativos. En ambos análisis, los componentes principales estuvieron determinados principalmente por la contribución de la clorofila b, los carotenoides totales y, en menor medida, la clorofila a, confirmando que las diferencias entre tratamientos fueron más evidentes bajo condiciones de luz, mientras que en sombra el contenido de pigmentos fotosintéticos mostró una respuesta más homogénea, en concordancia con los resultados obtenidos en las **Figuras 16 y 17**.

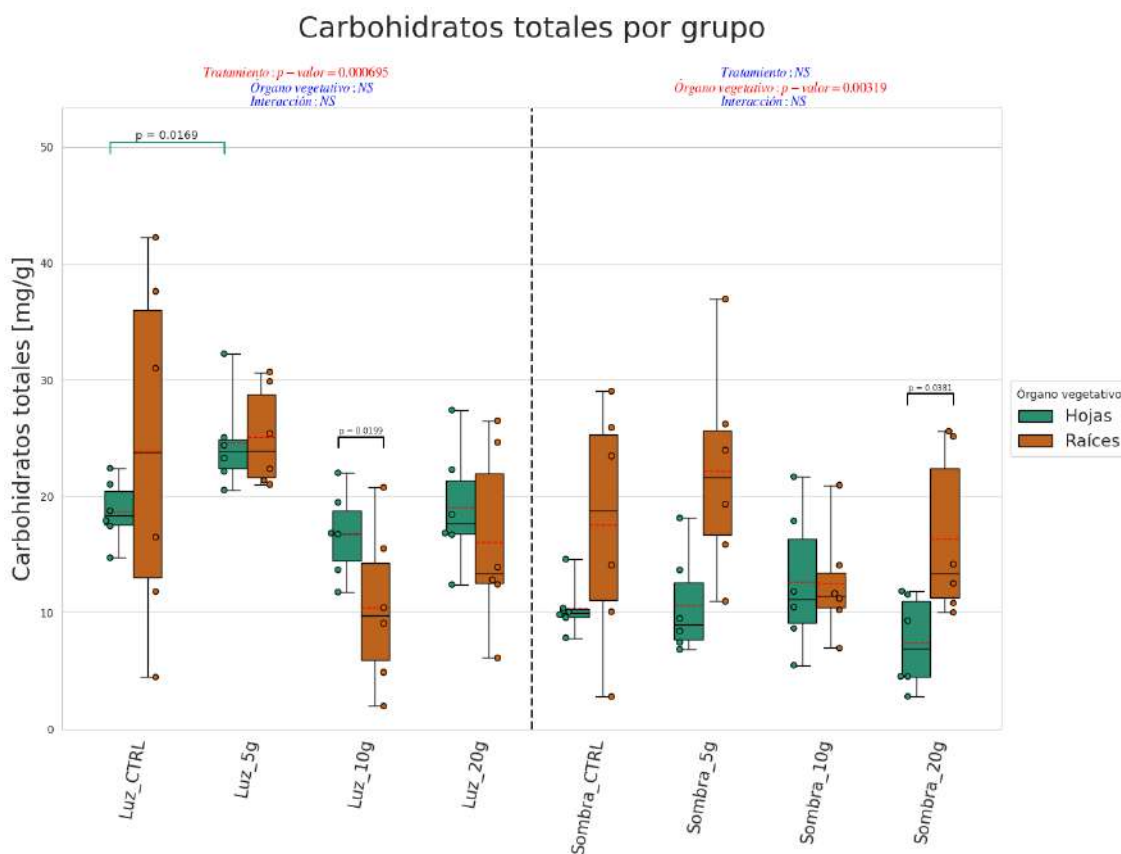
4.4 Modulación de metabolitos primarios y secundarios

Con el propósito de evaluar la respuesta bioquímica de las plántulas de copoazú ante la aplicación de pulpa de café bajo las condiciones lumínicas estudiadas, se determinaron metabolitos relacionados con el metabolismo primario y secundario. Los resultados se presentan mediante diagramas de caja y bigotes, permitiendo comparar el comportamiento de los diferentes tratamientos.

Nota. Las gráficas muestran la concentración de carbohidratos totales, proteínas, fenoles y flavonoides en hojas y raíces de copoazú bajo diferentes dosis de pulpa de café y dos regímenes lumínicos. La línea vertical punteada separa las condiciones de luz y sombra, mientras que los colores diferencian el órgano vegetal evaluado: hojas en verde y raíces en naranja. Las barras superiores indican comparaciones con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 18.

Concentración de azúcares totales en hojas y raíces de copoazú tratadas con pulpa de café



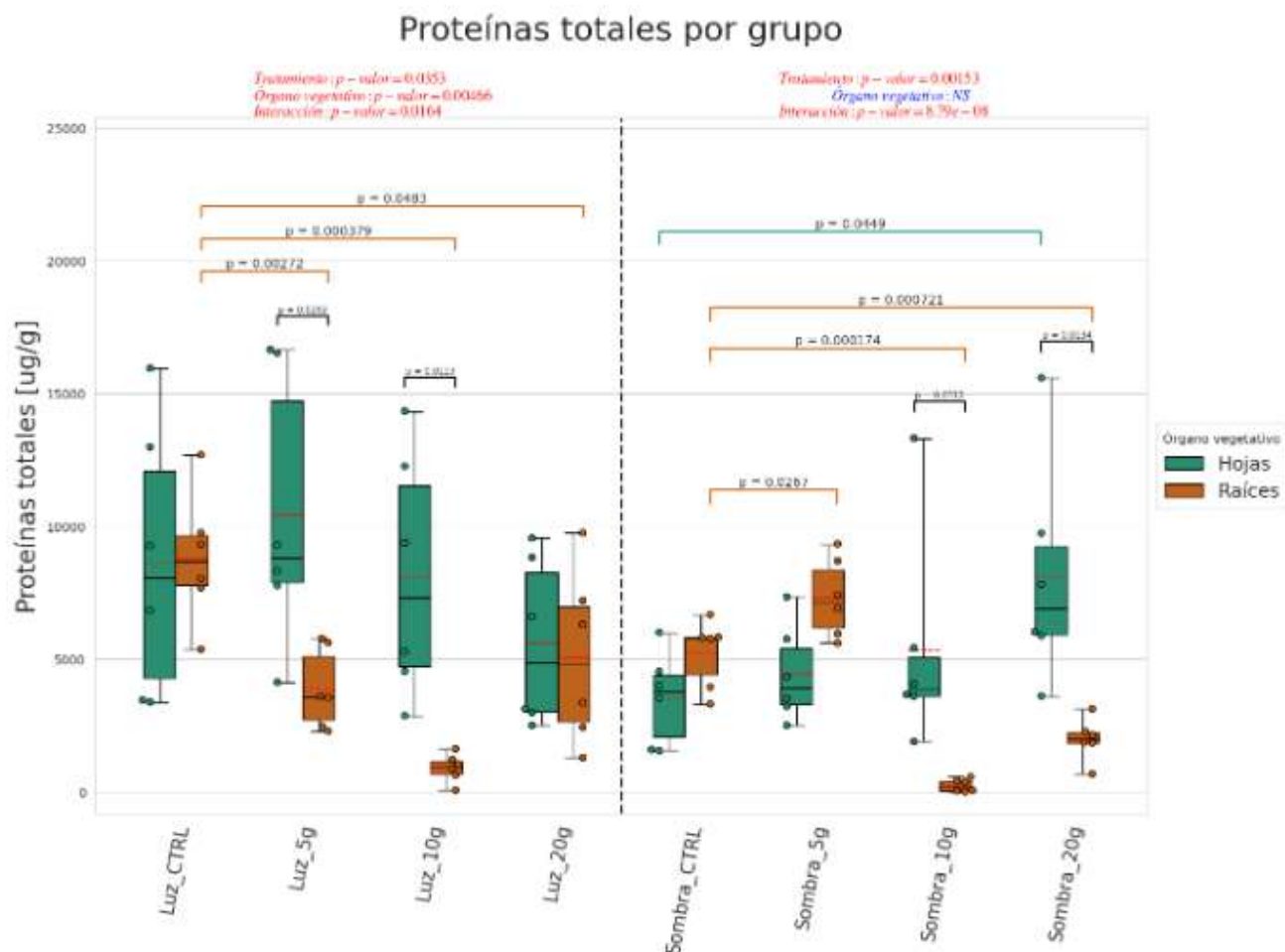
La **Figura 18** presenta la concentración de azúcares totales en hojas y raíces de plántulas de copoazú sometidas a diferentes dosis de pulpa de café y dos condiciones lumínicas. Bajo condiciones de luz, se observó un efecto significativo de los tratamientos sobre el contenido de azúcares totales ($p = 0,000695$). Los valores promedio $\pm$ error estándar correspondientes a cada tratamiento se presentan en el **Apéndice 12**.

En particular, bajo condiciones de luz, las hojas tratadas con 5 g presentaron una concentración de azúcares totales significativamente mayor que el control, alcanzando $24,59 \pm 0,41$ mg/gPF frente a $18,70 \pm 0,86$ mg/gPF. Aunque no se observaron diferencias significativas

entre los demás tratamientos, la dosis de 5 g mostró la mayor acumulación de carbohidratos tanto en hojas como en raíces ($25,10 \pm 1,23$ mg/gPS), mientras que el tratamiento con 10 g presentó los menores valores, especialmente en raíces ($10,44 \pm 1,22$ mg/gPS). Por su parte, bajo condiciones de sombra, las raíces tendieron a presentar mayores concentraciones de azúcares que las hojas independientemente de la dosis aplicada, destacándose el tratamiento con 5 g, con $22,20 \pm 1,45$ mg/gPS en raíces, frente a $10,66 \pm 0,51$ mg/gPF en hojas. En conjunto, estos resultados evidencian una mayor acumulación de carbohidratos en raíces bajo sombra y una respuesta más marcada al tratamiento de 5 g bajo condiciones de luz.

Figura 19.

Concentración de proteínas totales en hojas y raíces de copoazú tratadas con pulpa de café



La **Figura 19** presenta la concentración de proteínas totales en hojas y raíces de plántulas de copoazú tratadas con diferentes dosis de pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra. En la condición de luz, las hojas presentaron concentraciones de proteínas significativamente mayores que las raíces en los tratamientos de 5 y 10 g. De acuerdo con los valores del **Apéndice 13**, la dosis de 5 g alcanzó $1044,48 \pm 53,63 \mu\text{g/gPF}$ en hojas, mientras que en raíces se registraron $387,80 \pm 13,66 \mu\text{g/gPF}$; de forma similar, con 10 g las hojas presentaron $810,60 \pm 22,49 \mu\text{g/gPF}$, frente a $90,56 \pm 3,48 \mu\text{g/gPF}$ en raíces. Asimismo, en las raíces se evidenció una

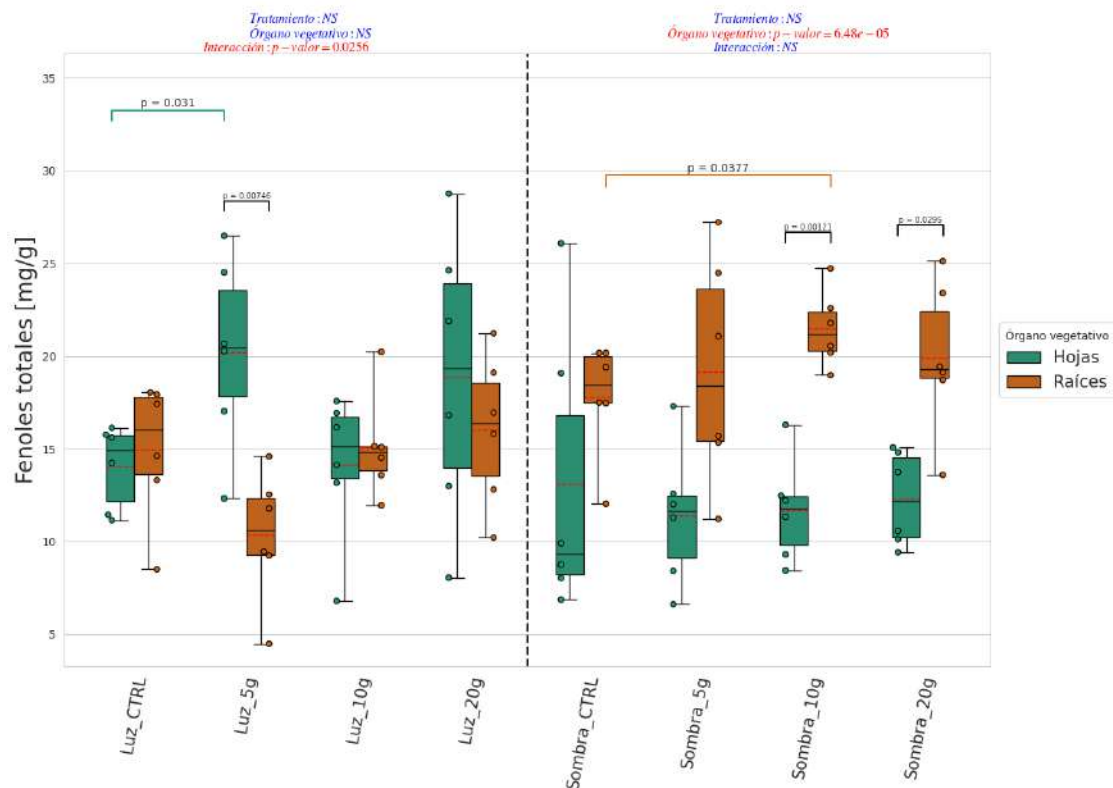
disminución significativa de la concentración de proteínas en las dosis de 5 y 10 g respecto al control ($880,53 \pm 60,38 \mu\text{g/gPF}$), mientras que en las hojas no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos.

Bajo condiciones de sombra, las raíces tratadas con 5 g presentaron una concentración de proteínas significativamente mayor que el control, alcanzando $731,26 \pm 41,48 \mu\text{g/gPF}$, frente a $521,95 \pm 8,44 \mu\text{g/gPF}$ en el control. Sin embargo, las dosis de 10 y 20 g disminuyeron significativamente hasta $24,26 \pm 4,43$ y $198,26 \pm 8,01 \mu\text{g/gPF}$, respectivamente. En las hojas solo se detectaron diferencias significativas para la dosis de 20 g, alcanzando $810,63 \pm 16,41 \mu\text{g/gPF}$, frente a $353,21 \pm 5,83 \mu\text{g/gPF}$ en el control. En conjunto, estos resultados evidencian una respuesta diferencial entre órganos, donde bajo luz la mayor acumulación de proteínas se concentró en las hojas, mientras que bajo sombra la respuesta más marcada se observó en las raíces tratadas con 5 g.

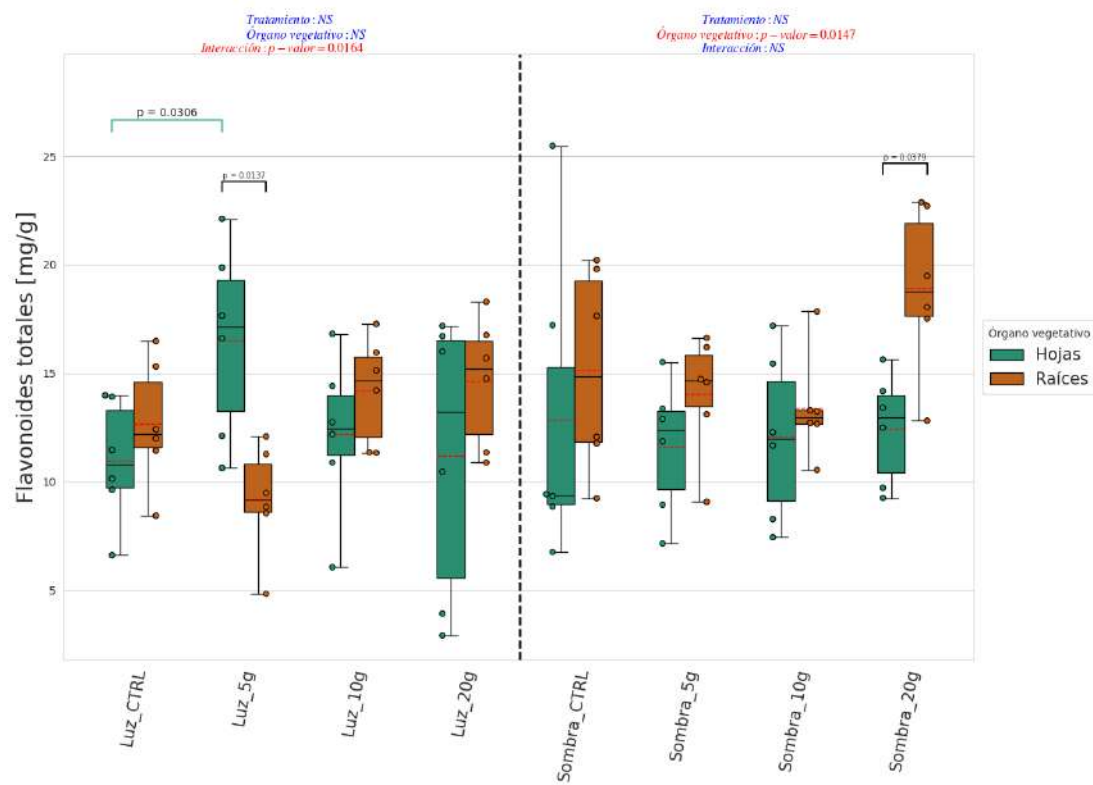
Figura 20.

Concentración de Fenoles y Flavonoides en hojas y raíces de copoazú tratadas con pulpa de café

a) Fenoles totales por grupo



b) Flavonoides totales por grupo



La **Figura 20** muestra la concentración de fenoles (a) y flavonoides (b) totales en hojas y raíces de plántulas de copoazú sometidas a diferentes dosis de pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra. Para los fenoles totales (**Figura 20a**), bajo condiciones de luz no se observaron efectos significativos asociados con el tratamiento ni con el órgano vegetal ($p > 0,05$); sin embargo, la interacción entre ambos factores fue significativa ($p = 0,0256$). Las comparaciones múltiples mostraron que las hojas tratadas con 5 g presentaron una concentración de fenoles significativamente mayor que el control y que las raíces del mismo tratamiento. De acuerdo con los valores del **Apéndice 14**, esta respuesta correspondió a $20,22 \pm 0,48$ mg/gPF en hojas, frente a $14,06 \pm 1,19$ mg/gPF en el control y $10,35 \pm 0,15$ mg/gPS en las raíces del mismo tratamiento. No se evidenciaron diferencias significativas entre los demás tratamientos. Bajo condiciones de sombra, el tratamiento no presentó un efecto significativo ($p > 0,05$). En estas condiciones, las raíces presentaron concentraciones de fenoles significativamente mayores que las hojas en los tratamientos de 5, 10 y 20 g, alcanzando valores de $19,17 \pm 0,34$, $21,47 \pm 0,22$ y $19,90 \pm 0,40$ mg/gPS, respectivamente.

Para los flavonoides totales (**Figura 20b**), bajo condiciones de luz no se detectaron efectos significativos del tratamiento ($p > 0,05$); no obstante, la interacción entre ambos factores fue significativa ($p = 0,0164$). En este ambiente, las hojas tratadas con 5 g presentaron una concentración de flavonoides significativamente mayor que el control y que las raíces del mismo tratamiento. Según el **Apéndice 15**, las hojas alcanzaron $16,50 \pm 0,63$ mg/gPF, mientras que el control registró $10,96 \pm 0,17$ mg/gPF y las raíces del mismo tratamiento $9,18 \pm 0,17$ mg/gPS. Bajo condiciones de sombra, el tratamiento no mostró un efecto significativo ($p > 0,05$), mientras que el órgano vegetativo presentó un efecto significativo ($p = 0,0147$), sin interacción significativa entre los factores ($p > 0,05$). En general, las raíces tendieron a presentar mayores

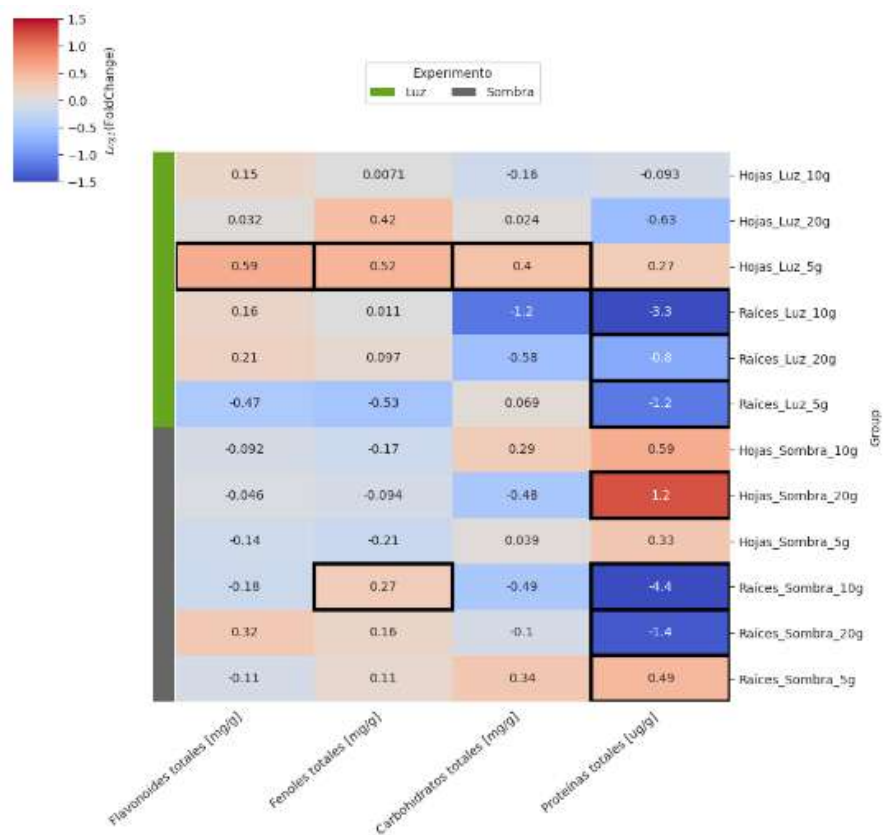
concentraciones de flavonoides que las hojas, observándose una diferencia significativa entre ambos órganos únicamente en el tratamiento de 20 g, donde las raíces alcanzaron $18,91 \pm 0,21$ mg/gPS, frente a $12,45 \pm 0,17$ mg/gPF en las hojas.

4.5 Integración de todas las variables evaluadas

Con el propósito de obtener una visión integrada de los efectos de la pulpa de café sobre las plántulas de copoazú, se realizó un análisis conjunto de las variables evaluadas. Los resultados se presentan mediante herramientas que permiten visualizar patrones globales de respuesta y explorar las relaciones existentes entre los diferentes indicadores bioquímicos, facilitando la identificación de asociaciones relevantes dentro del sistema estudiado.

Figura 21.

Mapa de calor de la respuesta conjunta de metabolitos primarios y secundarios en plantas de copoazú tratadas con pulpa de café



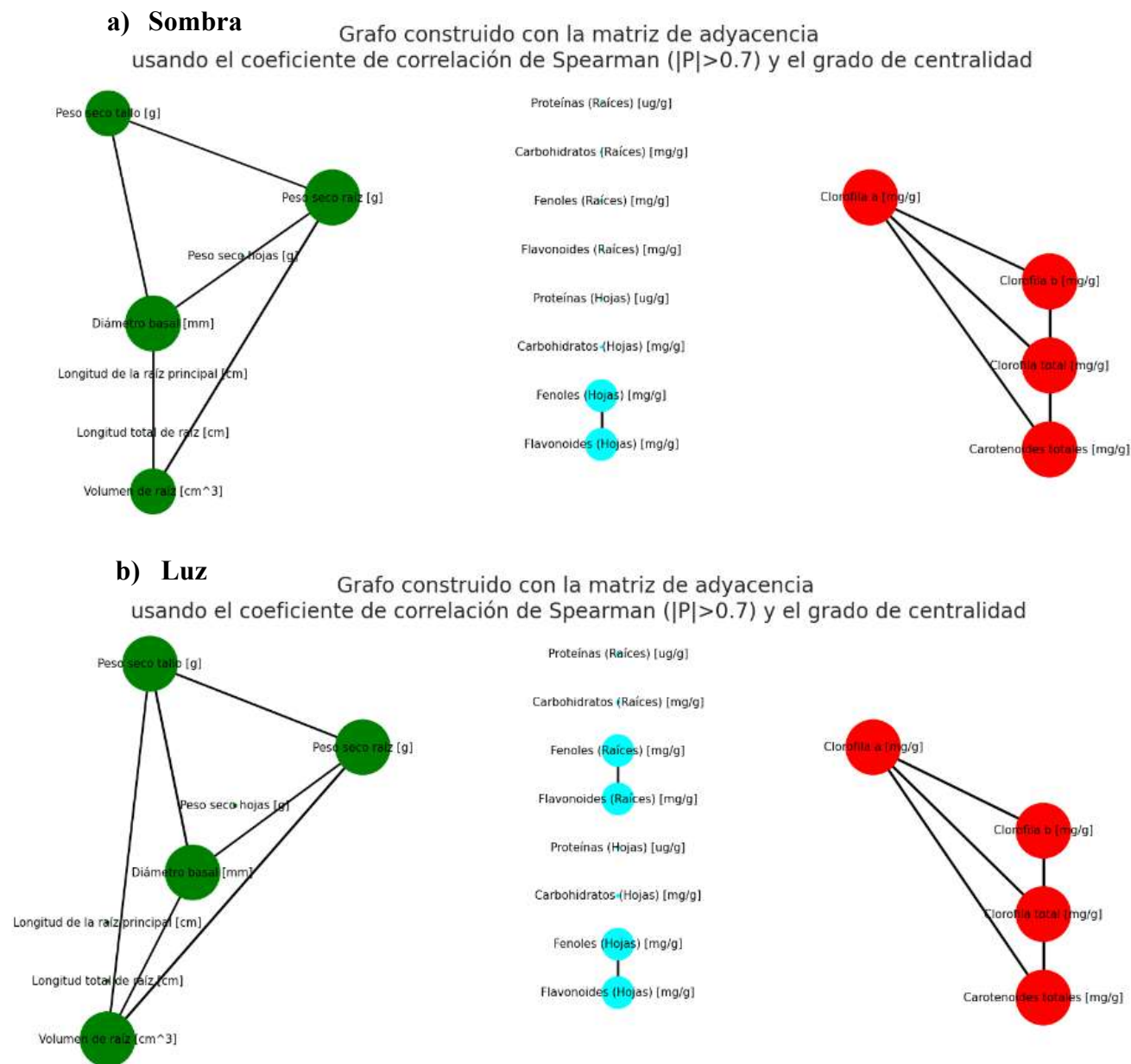
Nota. El mapa de calor presenta la respuesta conjunta de los metabolitos primarios, representados por los carbohidratos y las proteínas totales, y de los metabolitos secundarios, correspondientes a los fenoles y flavonoides totales, determinados en hojas y raíces de plántulas de copoazú sometidas a diferentes dosis de pulpa de café bajo condiciones de alta irradiancia y sombra. Los valores representan la variación relativa de cada tratamiento con respecto al control de su respectiva condición lumínica, mientras que la intensidad del color refleja la magnitud de la respuesta. Los recuadros negros señalan las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

En términos generales, la **Figura 21** muestra que, bajo condiciones de luz las hojas mostraron una mayor proporción de respuestas positivas que las raíces, destacándose el tratamiento con 5 g, el cual presentó incrementos simultáneos en flavonoides, fenoles y carbohidratos respecto al control. En particular, este tratamiento mostró aumentos significativos en flavonoides y fenoles, evidenciados por los recuadros negros. Por el contrario, las proteínas tendieron a disminuir en la mayoría de los tratamientos, siendo la reducción más marcada en las raíces tratadas con 5 g.

Bajo condiciones de sombra, las respuestas fueron más variables entre órganos y tratamientos. Las hojas presentaron incrementos discretos en algunos metabolitos, mientras que las raíces exhibieron respuestas contrastantes según la dosis aplicada. En este ambiente, el tratamiento con 10 g mostró un incremento significativo en fenoles en raíces, mientras que el tratamiento con 5 g presentó un aumento significativo en proteínas radicales. En conjunto, el mapa de calor evidencia que la magnitud y dirección de la respuesta metabólica dependieron tanto de la dosis de pulpa de café como del órgano evaluado y de la condición lumínica.

Figura 22.

Red de correlaciones entre variables morfológicas, pigmentarias y bioquímicas de plantas de copoazú basada en el coeficiente de Spearman y el grado de centralidad



Nota. La red representa las asociaciones entre las variables evaluadas durante el experimento, construida a partir de correlaciones de Spearman con coeficientes absolutos superiores a 0,7. Cada nodo corresponde a una variable, mientras que las líneas indican

relaciones fuertes entre pares de variables. El tamaño de los nodos está determinado por su grado de centralidad, de modo que las variables con mayor número de conexiones presentan un mayor tamaño. Los colores agrupan las variables según su naturaleza: morfológicas y de biomasa (verde), bioquímicas (azul) y pigmentarias (rojo). La ausencia de conexiones indica una baja asociación con las demás variables bajo el criterio de correlación establecido.

En la **Figura 22** se presenta la red de correlaciones de Spearman, la cual permite identificar pares de variables que tendieron a variar de forma conjunta. Es importante aclarar que la existencia de una correlación no establece una relación causal entre las variables, sino que indica únicamente que ambas presentan un comportamiento asociado o una tendencia similar. En ambos ambientes se observaron agrupamientos entre variables morfológicas, pigmentarias y bioquímicas, evidenciando una respuesta fisiológica coordinada entre las variables evaluadas. Las variables morfológicas y de biomasa, como el diámetro basal, el peso seco del tallo, el peso seco de la raíz y el volumen radicular, conformaron el agrupamiento más interconectado, mientras que las clorofilas y los carotenoides se asociaron entre sí dentro del grupo de pigmentos fotosintéticos. Entre las variables bioquímicas, las correlaciones más consistentes se presentaron entre fenoles y flavonoides, tanto en hojas como en raíces.

Al comparar ambas condiciones de cultivo, la red correspondiente a la alta irradiancia presentó dos conexiones adicionales que no estuvieron presentes en las plantas cultivadas bajo sombra. Este comportamiento es consistente con los resultados obtenidos en las demás variables evaluadas, los cuales mostraron que la dosis de 5 g produjo la respuesta más favorable bajo alta irradiancia, caracterizada por un mayor crecimiento, una mejor conservación de los pigmentos fotosintéticos y una respuesta antioxidante más eficiente.

5 Discusión de resultados

Los resultados obtenidos evidenciaron que la aplicación de pulpa de café indujo una respuesta integral en las plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*), influyendo tanto las propiedades fisicoquímicas del suelo como diversos procesos fisiológicos y metabólicos relacionados con el crecimiento vegetal. Debido a que estas respuestas estuvieron estrechamente interconectadas, la presente discusión se desarrolla siguiendo una secuencia fisiológica que integra los cambios ocurridos en el ambiente edáfico con las respuestas observadas en la planta, permitiendo interpretar las respuestas observadas mediante mecanismos fisiológicos que relacionan la disponibilidad de nutrientes con el funcionamiento fotosintético, el metabolismo y el crecimiento.

La pulpa de café es un residuo agroindustrial que presenta un considerable potencial para su aprovechamiento como bioestimulante agrícola, debido a la presencia de materia orgánica, nutrientes minerales y compuestos bioactivos. Estos componentes pueden modificar las propiedades del suelo y, a su vez, influir en diversos procesos fisiológicos de las plantas. En este sentido, diferentes estudios han señalado que los bioestimulantes de origen biológico pueden contribuir al mejoramiento de la fertilidad del suelo, favorecer la disponibilidad y absorción de nutrientes y estimular mecanismos relacionados con el crecimiento, la productividad y la respuesta de las plantas frente a distintas condiciones de estrés (Mussatto et al., 2011; Rouphael & Colla, 2020).

En el presente estudio, la respuesta de las plántulas estuvo determinada tanto por la dosis de pulpa de café aplicada como por el régimen lumínico al que fueron sometidas. Aunque las dosis más altas generaron modificaciones más evidentes en algunas propiedades del suelo, las respuestas fisiológicas y metabólicas no siguieron un comportamiento lineal, lo que sugiere la

existencia de un intervalo de aplicación en el que los efectos benéficos derivados del aporte de nutrientes y compuestos bioactivos alcanzan su máxima eficacia. Este comportamiento coincide con la naturaleza dosis-dependiente descrita para numerosos bioestimulantes, cuyos efectos fisiológicos no aumentan necesariamente de forma proporcional con la cantidad aplicada (Vargas et al., 2017; Van Oosten et al., 2017).

Asimismo, las diferencias observadas entre las condiciones de luz y sombra indican que la eficacia de la bioestimulación dependió del estado fisiológico de las plantas. Bajo irradiación solar directa, donde el aparato fotosintético puede estar expuesto a una mayor presión fotooxidativa (Takahashi & Murata., 2008), la aplicación de pulpa de café presentó respuestas más evidentes en variables relacionadas con la fotosíntesis y el metabolismo antioxidante. Este comportamiento concuerda con el concepto actual de bioestimulación vegetal, según el cual estos productos expresan gran parte de su potencial cuando las plantas enfrentan condiciones de estrés que demandan ajustes fisiológicos y metabólicos adicionales (Van Oosten et al., 2017; Bulgari et al., 2019).

Es importante señalar que las interpretaciones mecánicas planteadas en esta discusión se fundamentan en la integración de los resultados experimentales con la evidencia disponible en la literatura. En consecuencia, procesos como la regulación del estado redox celular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la actividad de enzimas antioxidantes (CAT, APX, GPX, POD y SOD), la activación de la vía fenilpropanoide mediante la fenilalanina amonio liasa (PAL), la fotoprotección del aparato fotosintético, la redistribución de fotoasimilados, la dinámica de síntesis y degradación de proteínas y otros procesos fisiológicos relacionados con el efecto bioestimulante se presentan como mecanismos potenciales que permiten contextualizar las respuestas observadas, mas no como procesos demostrados

experimentalmente, ya que dichas variables no fueron evaluadas de manera directa en este estudio. En consecuencia, la discusión que se presenta a continuación analiza cómo las modificaciones inducidas inicialmente en el ambiente edáfico desencadenaron una serie de respuestas nutricionales, fotosintéticas y metabólicas que, de manera integrada, explican el comportamiento observado en las plántulas de copoazú.

5.1 Influencia de la pulpa de café sobre las propiedades del suelo y el crecimiento vegetal

5.1.1 Modificación de las propiedades fisicoquímicas del suelo

Las respuestas fisiológicas y metabólicas observadas en las plántulas de copoazú deben interpretarse inicialmente a partir de las modificaciones que la pulpa de café indujo sobre el ambiente edáfico. Más que constituir una fuente adicional de nutrientes, este residuo agroindustrial actuó como una enmienda orgánica capaz de transformar la matriz química del sustrato mediante procesos de mineralización, humificación e intercambio catiónico, modificando la disponibilidad de nutrientes y la capacidad del suelo para retenerlos y liberarlos de forma gradual. Como consecuencia, se registraron incrementos en el pH, el carbono orgánico, el nitrógeno total, la materia orgánica y la capacidad de intercambio catiónico (CIC), evidenciando una mejora general de la fertilidad del suelo. Este comportamiento coincide con lo reportado para residuos derivados del café, cuyo aporte de materia orgánica favorece simultáneamente la calidad química, física y biológica del suelo (Sánchez et al., 2023; Bomfim et al., 2023).

Uno de los cambios más notorios fue el incremento progresivo del pH al aumentar la dosis de pulpa de café. Este comportamiento se explica por la liberación de cationes básicos, principalmente calcio (Ca^{2+}), potasio (K^{+}) y magnesio (Mg^{2+}), los cuales desplazan protones (H^{+}) y aluminio intercambiable (Al^{3+}) de los complejos de intercambio del suelo (Takala, 2021).

Paralelamente, la formación de sustancias húmicas incorpora grupos carboxilo y fenólicos capaces de generar nuevas cargas negativas y complejar Al^{3+} , reduciendo su actividad en la solución del suelo y contribuyendo a amortiguar la acidez (López et al., 2002). En conjunto, estos procesos favorecieron un ambiente químico más estable y potencialmente más favorable para la disponibilidad de nutrientes (Barrow & Hartemink., 2023)

No obstante, aunque la corrección de la acidez representa una ventaja para muchos suelos tropicales, los valores de pH cercanos a la neutralidad registrados en las dosis más altas sugieren una posible sobrecorrección respecto a las condiciones naturales en las que se desarrolla el género *Theobroma*, adaptado a suelos ácidos propios de ecosistemas tropicales húmedos (Tratado de Cooperación Amazónica y FAO, 1999). Bajo estas condiciones, el aumento del pH puede modificar la especiación química de algunos elementos y disminuir la solubilidad de micronutrientes como el hierro, cuya disponibilidad decrece rápidamente conforme aumenta el pH (Barrow & Hartemink., 2023). Por ello, el incremento del pH debe interpretarse como un proceso que mejora la fertilidad general del suelo, pero que también puede generar limitaciones nutricionales cuando las dosis aplicadas exceden el rango óptimo.

El aumento simultáneo de la materia orgánica, el carbono orgánico y el nitrógeno total refleja la intensa transformación bioquímica que experimentó la pulpa de café durante su descomposición. Este residuo aporta polisacáridos estructurales, lignina y compuestos nitrogenados que sirven como sustrato para la microbiota del suelo, favoreciendo procesos de humificación y mineralización (Mussatto et al., 2011). Mientras una fracción del carbono se estabiliza en forma de sustancias húmicas, el nitrógeno orgánico es transformado progresivamente hacia formas potencialmente disponibles para las plantas (Ayala et al., 2022; Takala, 2021). En consecuencia, el enriquecimiento del suelo fue dependiente de la dosis

aplicada, ya que una mayor incorporación de pulpa incrementó la disponibilidad de sustratos para la actividad microbiana y, con ello, la intensidad de estos procesos (Bomfim et al., 2023; Ayala et al., 2022).

Las condiciones de irradiancia también condicionaron la dinámica de la materia orgánica del sustrato. Bajo condiciones de sombra, se registraron mayores contenidos de carbono orgánico la materia orgánica, probablemente debido a que la menor temperatura y la mayor conservación de la humedad reducen la velocidad de oxidación del material orgánico y favorecen la estabilización del carbono en la fracción húmica (Ayala et al., 2022). En contraste, las condiciones de mayor exposición a la radiación favorecieron una mineralización más rápida del residuo y una mayor actividad respiratoria microbiana, incrementando las pérdidas de carbono en forma de CO₂ (Ayala et al., 2022). Estos resultados sugieren que la respuesta del suelo no estuvo determinada únicamente de la composición química de la pulpa, sino también por las condiciones ambientales, las cuales pudieron influir en la velocidad y el grado de transformación de sus componentes.

Como consecuencia del incremento de la materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico también aumentó de forma importante. Debido a la textura predominantemente arenosa del sustrato, este comportamiento estuvo asociado principalmente al desarrollo de cargas negativas en las sustancias húmicas y no a la fracción mineral del suelo (López et al., 2002). Los grupos funcionales presentes en estas moléculas incrementan la retención de cationes esenciales y reducen sus pérdidas por lixiviación, favoreciendo un suministro más gradual hacia la solución del suelo conforme son absorbidos por las raíces (López et al., 2002; Sparks., 1996). Desde una perspectiva química, estos resultados sugieren que la aplicación de pulpa de café no solo contribuyó al aporte de nutrientes, sino que también modificó la capacidad del sustrato para

retenerlos e influir en su disponibilidad. Esto podría favorecer condiciones de mayor estabilidad en el suministro de nutrientes para el desarrollo de las plántulas (Bomfim et al., 2023).

El incremento en la disponibilidad de nutrientes posterior a la incorporación de pulpa de café no se presentó de manera uniforme entre los elementos evaluados, sino que estuvo condicionado por sus características químicas y por la forma en que se encontraban asociados a la matriz vegetal. Los nutrientes presentes principalmente en forma iónica fueron liberados rápidamente durante la descomposición del residuo, mientras que aquellos integrados en compuestos orgánicos requirieron procesos de mineralización más prolongados antes de incorporarse a la solución del suelo (Mussatto et al., 2011). Esta diferencia explica el comportamiento diferencial registrado para los macro y micronutrientes evaluados.

Entre los macronutrientes, el potasio presentó el mayor incremento, alcanzando concentraciones cercanas a cuatro veces las del tratamiento control. Este comportamiento es consistente con la química de este elemento, ya que el K permanece principalmente como catión libre dentro de los tejidos vegetales y, por tanto, es uno de los primeros nutrientes liberados durante la degradación de la pulpa (Zoca et al., 2014). Posteriormente, una fracción importante del K^+ es retenida en los sitios de intercambio generados por la materia orgánica, reduciendo las pérdidas por lixiviación y manteniendo una mayor disponibilidad para las raíces (López et al., 2002).

El incremento del nitrógeno respondió a un mecanismo diferente, ya que este elemento forma parte de proteínas y otros compuestos orgánicos que requieren transformación microbiana antes de convertirse en formas asimilables por la planta (Takala, 2021). Por su parte, el aumento del magnesio estuvo favorecido tanto por su liberación durante la descomposición del residuo como por la mayor capacidad del suelo para retener cationes gracias al incremento de la CIC

(López et al., 2002). Desde una perspectiva fisiológica, ambos nutrientes adquieren especial importancia porque participan de forma directa en procesos relacionados con la síntesis proteica, la formación de clorofila y el metabolismo energético, proporcionando una base nutricional favorable para las respuestas fotosintéticas observadas posteriormente (Tränkner et al., 2018).

Los micronutrientes también presentaron una respuesta diferencial. El incremento de boro, manganeso y cobre no solo estuvo relacionado con el aporte realizado por la pulpa de café, sino también con el aumento de la materia orgánica, cuyos grupos funcionales favorecen la formación de complejos capaces de reducir la movilidad de estos elementos y prolongar su permanencia en la zona de exploración radical (López et al., 2002; Sparks., 1996). Esto explica que la disponibilidad de estos micronutrientes aumentara conforme se incrementó la dosis aplicada, evidenciando que la materia orgánica no solo aporta nutrientes, sino que también modifica su comportamiento químico dentro del suelo (Sánchez et al., 2023).

Considerando la evidencia obtenida, estos resultados podrían sugerir que la pulpa de café actuó como una enmienda orgánica con un proceso de liberación gradual de nutrientes, más que como un fertilizante mineral de efecto inmediato. Al aumentar la dosis aplicada, el incremento del carbono orgánico incorporado al suelo presumiblemente dinamizó la actividad de la microbiota edáfica y los procesos de mineralización de la materia orgánica, lo que explicaría el aumento progresivo en la disponibilidad de la mayoría de los nutrientes evaluados (Takala, 2021). Pese a ello, este comportamiento no implica que una mayor dosis produzca necesariamente una mejor respuesta fisiológica, ya que el enriquecimiento nutricional también modifica el equilibrio químico del suelo, aspecto que comienza a evidenciarse en las relaciones catiónicas discutidas a continuación (Tränkner et al., 2018).

La condición lumínica ejerció un efecto complementario sobre esta dinámica al modificar la velocidad de transformación del material orgánico. Bajo condiciones de sombra, la mayor estabilidad de la materia orgánica favoreció una liberación más gradual de los nutrientes, mientras que la exposición a radiación directa pudo acelerar los procesos de mineralización (Bomfim et al., 2023). No obstante, estas diferencias fueron menos determinantes que las asociadas con la dosis aplicada, indicando que el contenido de pulpa incorporado constituyó el principal factor responsable del enriquecimiento químico del suelo.

Aunque el aumento en la disponibilidad de nutrientes representa uno de los principales efectos favorables de la aplicación de pulpa de café, la calidad nutricional del suelo no está determinada únicamente por la concentración individual de cada elemento, sino también por el equilibrio entre los diferentes nutrientes presentes. En este estudio, el marcado aumento del potasio modificó progresivamente las relaciones Ca/K , Mg/K y $(\text{Ca}+\text{Mg})/\text{K}$, indicando un cambio en el balance catiónico del sistema. Estas relaciones reflejan la competencia catiónica que ocurre tanto en los complejos de intercambio del suelo como durante la absorción radical por lo que constituyen indicadores más representativos del estado nutricional que la concentración individual de cada nutriente (Tränkner et al., 2018).

Desde una perspectiva química, el incremento de K^+ favorece su permanencia en la solución del suelo y su adsorción sobre los sitios de intercambio, reduciendo la disponibilidad relativa de Ca^{2+} y Mg^{2+} debido a fenómenos de competencia iónica (López et al., 2002). Aunque este comportamiento no implica necesariamente una deficiencia de calcio o magnesio, sí puede alterar su absorción y utilización por la planta cuando el desequilibrio se mantiene en el tiempo (Tränkner et al., 2018). Esto adquiere especial relevancia en especies del género *Theobroma*, donde el calcio participa en la estabilidad de membranas y la señalización celular, mientras que

el magnesio es indispensable para la síntesis de clorofila y el funcionamiento de numerosas enzimas relacionadas con el metabolismo energético. En consecuencia, la disminución de las relaciones Ca/K y Mg/K constituye un posible factor limitante que debe considerarse al interpretar las respuestas fisiológicas observadas en las dosis más altas (Tränkner et al., 2018).

El fósforo presentó un comportamiento diferente al del resto de los macronutrientes, ya que sus concentraciones no mostraron una tendencia dosis-dependiente claramente definida. Este resultado sugiere que su disponibilidad estuvo controlada principalmente por procesos de adsorción, desorción y complejación dentro del suelo, más que por el aporte directo realizado por la pulpa de café (Hinsinger, 2001). En suelos tropicales, la materia orgánica y el pH modifican continuamente el equilibrio entre las diferentes formas químicas del fósforo, por lo que cambios importantes en estos parámetros no necesariamente se reflejan en incrementos proporcionales de la fracción disponible (Hinsinger, 2001; Barrow & Hartemink., 2023).

Entre los micronutrientes, el hierro mostró una tendencia opuesta a la observada para boro, manganeso y cobre. A medida que aumentó el pH, disminuyó progresivamente la disponibilidad de hierro, comportamiento consistente con la baja solubilidad del Fe^{3+} en condiciones cercanas a la neutralidad, donde predominan reacciones de hidrólisis y precipitación como hidróxidos férricos (Barrow & Hartemink., 2023). En contraste, el aumento en la disponibilidad de boro, manganeso y cobre pudo estar asociado tanto con el aporte de estos elementos por la pulpa de café como con la capacidad de la materia orgánica para formar complejos con especies metálicas, favoreciendo su retención y disminuyendo su pérdida del sistema (López et al., 2002; Sánchez et al., 2023). Estos resultados evidencian que la disponibilidad de micronutrientes depende de procesos de especiación química particulares para

cada elemento y no únicamente de su concentración total en el suelo (Barrow & Hartemink., 2023).

En este contexto, los resultados evidencian que la incorporación de pulpa de café favoreció la fertilidad química del suelo, principalmente mediante el aporte de materia orgánica, el aumento de la capacidad de intercambio catiónico y la liberación progresiva de nutrientes (Bomfim et al., 2023; Sánchez et al., 2023). No obstante, las dosis más elevadas también comenzaron a generar modificaciones en el equilibrio catiónico y en la disponibilidad de algunos micronutrientes, particularmente del hierro, indicando que una mayor concentración de nutrientes no siempre representa una condición nutricional más favorable para la planta (Tränkner et al., 2018). En consecuencia, los cambios edáficos observados constituyen el contexto edáfico sobre el cual se desarrollaron las respuestas fisiológicas del copoazú, pero no las determinan por sí solos. El crecimiento y la respuesta fisiológica de las plántulas estuvieron condicionados por su capacidad para absorber, redistribuir y aprovechar los nutrientes disponibles bajo las distintas condiciones de irradiancia. En este sentido, las variaciones morfológicas descritas en la siguiente sección pueden interpretarse como resultado de la interacción entre los cambios en las propiedades químicas del sustrato y los mecanismos de regulación fisiológica propios de la especie.

5.1.2 Respuesta morfológica y asignación de biomasa

Las modificaciones observadas en las propiedades fisicoquímicas del suelo se reflejaron posteriormente en el crecimiento de las plántulas, aunque la respuesta no fue homogénea entre las diferentes variables morfológicas (**Figura 13**). Los cambios más consistentes ocurrieron en el sistema radicular, particularmente en el volumen de raíz y el diámetro basal, mientras que variables como la longitud de la raíz y la biomasa seca aérea presentaron respuestas menos

marcadas. Este comportamiento indica que la pulpa de café no promovió un crecimiento uniforme de toda la planta, sino una redistribución de recursos hacia estructuras directamente relacionadas con la adquisición y el transporte de agua y nutrientes. Diversos estudios señalan que los bioestimulantes de origen orgánico inducen inicialmente modificaciones en la arquitectura de crecimiento y en la eficiencia fisiológica antes que incrementos importantes en biomasa (Rouphael & Colla., 2020).

El volumen de la raíz aumentó significativamente, mientras que la longitud total de las raíces permaneció prácticamente constante. Esta respuesta sugiere que la pulpa de café favoreció modificaciones en la arquitectura radical, promoviendo el desarrollo de raíces laterales y el engrosamiento del sistema radical más que un simple proceso de elongación. En términos fisiológicos, este comportamiento concuerda con mecanismos descritos para bioestimulantes orgánicos, en los cuales la mayor disponibilidad de nutrientes y la modulación del balance hormonal favorecen la diferenciación de raíces laterales y aumentan la capacidad de exploración del suelo (Shahzad & Amtmann., 2017). En consecuencia, el incremento del volumen radicular probablemente permitió ampliar la superficie disponible para la absorción de agua y nutrientes, sin requerir un aumento proporcional en la longitud total de las raíces.

El incremento del diámetro basal y del área foliar complementa esta interpretación. Un mayor diámetro del tallo, observado principalmente en las dosis de 5 y 20 g, refleja un mayor desarrollo estructural de la planta y favorece el soporte de los tejidos y el funcionamiento del sistema vascular (Taiz et al., 2015). Asimismo, el incremento del área foliar indica una mayor inversión en tejido fotosintéticamente activo, incrementando el potencial de interceptación de radiación antes que la acumulación de biomasa estructural. Esto explica por qué variables como el peso seco de hojas y tallos no presentaron diferencias significativas durante el periodo

experimental, ya que la expansión foliar ocurre como consecuencia de procesos de división y expansión celular, mientras que la acumulación de biomasa requiere un periodo más prolongado de fijación y redistribución de carbono (Poorter et al., 2012).

La respuesta morfológica tampoco siguió una relación lineal con la dosis aplicada. Mientras las dosis de 5 y 20 g promovieron los mayores incrementos en las variables de crecimiento, la dosis intermedia de 10 g presentó, de manera consistente, una respuesta menos favorable. Aunque este comportamiento no puede atribuirse a un mecanismo específico con la información disponible, sí evidencia que el efecto bioestimulante de la pulpa de café dependió de la interacción entre múltiples procesos fisiológicos y no únicamente de un mayor aporte de nutrientes. Este tipo de respuestas no lineales ha sido descrito para diversos bioestimulantes de origen biológico, cuya eficacia depende del equilibrio entre la concentración de compuestos bioactivos, la disponibilidad de nutrientes y el estado fisiológico de la planta, más que del incremento progresivo de la dosis aplicada (Vargas et al., 2017; Rouphael & Colla., 2020).

Las diferencias morfológicas fueron más evidentes en las plantas cultivadas bajo sombra y se manifestaron principalmente hacia el final del experimento. Este comportamiento es consistente con la ecología del copoazú, una especie adaptada al sotobosque amazónico, donde las condiciones de menor irradiancia favorecen el crecimiento vegetativo y la expansión foliar (Tratado de Cooperación Amazónica y FAO, 1999). En contraste, bajo irradiación solar directa es probable que una mayor proporción del carbono fijado se destinara al mantenimiento celular y a mecanismos de protección frente al estrés lumínico, reduciendo la cantidad de recursos disponibles para el crecimiento estructural (Wu et al., 2025). Asimismo, la aparición de diferencias principalmente al final del experimento concuerda con la naturaleza de la pulpa de café como una enmienda orgánica de liberación gradual, cuyos efectos dependen de la

descomposición del material, la mineralización de nutrientes y su posterior incorporación al metabolismo vegetal (Mussatto et al., 2011; Takala, 2021).

Desde esta perspectiva, los resultados sugieren que las mejoras en la fertilidad del suelo se reflejaron en una redistribución del crecimiento vegetal, con un mayor favorecimiento del desarrollo del sistema radicular y de la superficie fotosintética frente a la acumulación de biomasa. Esto indica que la respuesta morfológica estuvo determinada por la interacción entre la disponibilidad de nutrientes, las condiciones de irradiancia y los mecanismos de regulación fisiológica propios de la especie. Estas modificaciones estructurales constituyen la base sobre la cual se desarrollaron posteriormente las diferencias observadas en la actividad fotosintética, los pigmentos y el metabolismo de las plántulas.

5.2 Respuesta de los pigmentos fotosintéticos a la aplicación de pulpa de café y a la alta irradiancia

Las mejoras observadas previamente en el sistema radical y en el desarrollo vegetativo indican que la aplicación de pulpa de café favoreció un ambiente nutricional más adecuado para el crecimiento de las plántulas. Sin embargo, una mayor disponibilidad de nutrientes no garantiza por sí misma un mejor desempeño fisiológico, ya que su aprovechamiento está condicionado por la capacidad del aparato fotosintético para convertir la energía lumínica en energía química. En este sentido, el contenido de clorofilas y carotenoides constituye un indicador del estado funcional del aparato fotosintético y de la capacidad de las plantas para mantener una respuesta fotosintética adecuada bajo diferentes condiciones de irradiancia (Taiz et al., 2015).

La cuantificación de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides evidenció que la aplicación de pulpa de café promovió significativamente la acumulación de estos pigmentos en las plantas sometidas a irradiación solar directa. En contraste, bajo condiciones de sombra no se

observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 16**). Este comportamiento sugiere que la respuesta inducida por la pulpa dependió del contexto fisiológico de las plántulas y no únicamente del aporte de nutrientes. En condiciones de baja irradiancia, la energía absorbida por los fotosistemas es utilizada eficientemente en las reacciones fotoquímicas y la necesidad de activar mecanismos adicionales de protección es limitada (Demmig-Adams & Adams., 1996). En este contexto, el efecto bioestimulante tiende a ser menos evidente, ya que estos productos expresan su mayor potencial cuando las plantas enfrentan condiciones de estrés abiótico (Bulgari et al., 2019).

En contraste, bajo irradiación solar directa aumenta la probabilidad de que la energía absorbida exceda la capacidad del aparato fotosintético para utilizarla en las reacciones fotoquímicas. Esta condición puede favorecer la sobreredución de la cadena de transporte de electrones y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), promoviendo procesos de fotoinhibición y fotodaño que afectan principalmente al fotosistema II mediante la degradación de la proteína D1 y la pérdida progresiva de eficiencia fotoquímica (Takahashi & Murata, 2008). Aunque estos procesos no fueron evaluados directamente en el presente estudio, constituyen mecanismos ampliamente descritos para plantas sometidas a alta irradiancia. En este escenario, los carotenoides pueden desempeñar un papel esencial al disipar el exceso de energía mediante el ciclo de las xantofilas y limitar la acumulación de ROS, preservando la estabilidad de los complejos fotosintéticos (Demmig-Adams & Adams., 1996).

Desde esta perspectiva, el mayor contenido de clorofilas observado en las plantas tratadas con pulpa de café no necesariamente representa únicamente una estimulación de la síntesis de pigmentos, sino que puede interpretarse como un indicador de una mayor estabilidad del aparato fotosintético frente a la exposición a condiciones de elevada irradiancia. Esta respuesta es

consistente con la composición química de la pulpa de café, rica en compuestos fenólicos y otros metabolitos con actividad antioxidante (Martínez et al., 2019) que podrían contribuir a mantener el equilibrio redox celular y reducir el deterioro oxidativo de membranas, proteínas y pigmentos fotosintéticos (Martínez et al., 2024). Aunque en este estudio no se cuantificó directamente la producción de ROS, la conservación simultánea de clorofilas y carotenoides es consistente con una mayor estabilidad del aparato fotosintético en las plántulas tratadas bajo condiciones de elevada irradiancia. Este comportamiento coincide con estudios realizados con bioestimulantes de origen vegetal, cuyos efectos se expresan principalmente cuando las plantas enfrentan condiciones de estrés y no durante un crecimiento libre de limitaciones ambientales (Van Oosten et al., 2017; Bulgari et al., 2019).

La respuesta de los pigmentos tampoco fue proporcional al incremento de la dosis de pulpa de café. La dosis de 5 g produjo los mayores contenidos de clorofilas y carotenoides, incluso por encima de la dosis de 20 g, lo que indica que la estabilidad del aparato fotosintético dependió del equilibrio entre la disponibilidad de nutrientes y la capacidad fisiológica de la planta para utilizarlos eficientemente, más que de un incremento continuo en la dosis aplicada (Rouphael & Colla., 2020). Esta respuesta podría estar relacionada con las modificaciones químicas del suelo discutidas anteriormente, ya que las dosis más altas incrementaron la disponibilidad de nutrientes, pero también promovieron una mayor alcalinización, alteraron las relaciones Ca/K y Mg/K y redujeron la disponibilidad de hierro. Estos cambios podrían afectar indirectamente la biosíntesis de clorofila y el transporte electrónico fotosintético, considerando que el hierro participa en citocromos y ferredoxina, mientras que el magnesio constituye el átomo central de la molécula de clorofila y el calcio interviene en la estabilidad de membranas y procesos de señalización celular (Tränkner et al., 2018).

El comportamiento paralelo de clorofilas y carotenoides refleja la estrecha relación funcional entre ambos grupos de pigmentos. Mientras las clorofilas captan la energía luminosa necesaria para impulsar las reacciones fotoquímicas, los carotenoides regulan el exceso de energía absorbida y disminuyen el riesgo de fotooxidación. Por ello, el incremento simultáneo de ambos pigmentos es consistente con un ajuste coordinado entre la captación de energía y los mecanismos de fotoprotección, el cual podría haber sido favorecido por la aplicación de pulpa de café bajo elevada irradiancia (Demmig-Adams & Adams., 1996).

La conservación de los pigmentos fotosintéticos también proporciona un posible marco fisiológico para interpretar las respuestas de crecimiento observadas previamente. Un aparato fotosintético funcional suele asociarse con una mayor capacidad para generar ATP y NADPH durante la fase fotoquímica, asegurando el suministro de energía y poder reductor necesarios para el ciclo de Calvin y la síntesis de fotoasimilados (Taiz et al., 2015). Aunque estas variables no fueron determinadas directamente, este mecanismo ha sido ampliamente descrito para explicar la relación entre el mantenimiento de los pigmentos fotosintéticos y el crecimiento vegetal. Al mismo tiempo, la disminución del fotodaño reduce la necesidad de destinar carbono y energía a procesos de reparación celular, permitiendo una mayor asignación de recursos hacia la expansión foliar, el desarrollo radical y otros procesos de crecimiento (Takahashi & Murata., 2008).

En conjunto, los resultados sugieren que la pulpa de café no actuó únicamente mejorando la nutrición del suelo, sino que también podría haber contribuido al mantenimiento de la funcionalidad del aparato fotosintético cuando las plántulas fueron sometidas a condiciones de mayor irradiancia. Esta respuesta proporciona el vínculo entre las modificaciones edáficas discutidas previamente y las alteraciones metabólicas que se analizarán en las siguientes

secciones, ya que una mayor capacidad fotosintética podría proporcionar el soporte energético y metabólico necesario para la síntesis de proteínas, compuestos fenólicos, flavonoides y demás metabolitos involucrados en la respuesta fisiológica del copoazú frente al estrés.

5.3 Azúcares totales y ajustes del metabolismo primario

Las diferencias observadas en el contenido de clorofilas y carotenoides sugieren que la aplicación de pulpa de café contribuyó a mantener la estabilidad del aparato fotosintético de las plántulas bajo condiciones de alta irradiancia. No obstante, la estabilidad de los pigmentos solo adquiere significado fisiológico si se asocia con una mayor capacidad de fijación de carbono y una producción más eficiente de fotoasimilados. En este contexto, la cuantificación de los azúcares totales permitió evaluar si la mayor capacidad fotosintética potencial inferida a partir de la conservación de los pigmentos se reflejó en cambios reales del metabolismo primario.

Los carbohidratos constituyen los principales productos del ciclo de Calvin y representan la fuente inmediata de carbono y energía para los procesos de crecimiento, respiración y biosíntesis (Taiz et al., 2015). Además de su función energética, participan en el ajuste osmótico, la señalización metabólica y la regulación de numerosas rutas relacionadas con la respuesta al estrés, por lo que sus variaciones reflejan el estado funcional del metabolismo del carbono (Jeandet et al., 2022; Rosa et al., 2009). Asimismo, la disponibilidad de azúcares condiciona el suministro de esqueletos carbonados requeridos para la síntesis de aminoácidos, proteínas y metabolitos secundarios, estableciendo el vínculo entre el metabolismo primario y las respuestas bioquímicas que se discutirán posteriormente (Jeandet et al., 2022).

Los resultados evidenciaron que la respuesta de los azúcares dependió marcadamente del ambiente lumínico. Bajo condiciones de sombra no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En contraste, bajo irradiación directa, la aplicación de 5 g de

pulpa de café produjo la mayor acumulación de azúcares en las hojas, alcanzando valores significativamente superiores a los registrados en el tratamiento control. Este comportamiento reproduce el mismo patrón observado para las clorofilas y carotenoides, lo que sugiere que ambas respuestas podrían formar parte de un mismo proceso fisiológico.

Bajo condiciones de elevada irradiancia, la conservación del aparato fotosintético suele asociarse con un funcionamiento más eficiente de las reacciones fotoquímicas, favoreciendo potencialmente la producción de ATP y NADPH (Taiz et al., 2015). En consecuencia, podría mantenerse una mayor disponibilidad de energía y poder reductor para sostener la fijación de CO₂ y la síntesis de carbohidratos. Por el contrario, cuando ocurre fotodaño, la literatura describe una disminución progresiva de la eficiencia fotoquímica que limita la acumulación de azúcares (Nishiyama et al., 2011). Aunque estos procesos no fueron evaluados directamente en el presente estudio, el mayor contenido de carbohidratos registrado en las plantas tratadas con 5 g es consistente con la conservación de los pigmentos observada en la sección anterior y sugiere una respuesta coordinada del metabolismo del carbono.

El hecho de que la dosis de 5 g superara incluso a la de 20 g refuerza la idea de que la respuesta bioestimulante estuvo determinada por un equilibrio fisiológico y no por un incremento proporcional de la disponibilidad de nutrientes. Como se señaló anteriormente, las dosis más altas modificaron el balance catiónico del sustrato y disminuyeron la disponibilidad de hierro, elemento esencial para el funcionamiento de componentes asociados a la cadena de transporte electrónico fotosintético. Por tanto, un aumento en la fertilidad química del suelo no necesariamente se tradujo en una mayor eficiencia fotosintética, lo que podría explicar que la acumulación de azúcares alcanzara su máximo con la dosis de 5 g (Tränkner et al., 2018).

Otro resultado relevante fue la diferencia observada entre órganos según la condición lumínica. Bajo irradiación directa, el incremento de azúcares ocurrió principalmente en las hojas, mientras que bajo sombra las raíces presentaron concentraciones superiores independientemente del tratamiento aplicado.

Este comportamiento podría explicarse por cambios en la partición del carbono dentro de la planta. Bajo condiciones de elevada irradiancia, las hojas pueden incrementar la retención temporal de carbohidratos solubles cuando aumenta la demanda metabólica asociada al mantenimiento del aparato fotosintético y a las respuestas de protección descritas para este tipo de estrés (Takahashi & Murata., 2008; Nishiyama et al., 2011).

En condiciones de sombra ocurre un escenario diferente. La menor disponibilidad de radiación generalmente se asocia con una reducción de la tasa fotosintética y de la producción diaria de carbohidratos, por lo que la planta puede tender a redistribuir el carbono disponible hacia órganos de reserva y supervivencia, como el sistema radical. Esta estrategia podría contribuir a mantener la respiración de las raíces y asegurar la absorción de agua y nutrientes aun cuando la producción de fotoasimilados disminuye, fenómeno ampliamente descrito para especies leñosas sometidas a limitación lumínica (Rosa et al., 2009). En este sentido, la mayor concentración de azúcares en raíces bajo sombra probablemente refleja un cambio en la asignación del carbono más que un incremento de la fotosíntesis.

Es importante considerar que las determinaciones se realizaron utilizando peso fresco en hojas y peso seco en raíces, por lo que los valores absolutos entre órganos no son directamente comparables. No obstante, las tendencias observadas son consistentes con lo reportado para especies del género *Theobroma*, donde el contenido de carbohidratos disminuye cuando el

aparato fotosintético se ve comprometido por condiciones de estrés y aumenta cuando la planta mantiene una mayor capacidad de fijación de carbono (Oliveira da Conceição et al., 1997).

Más allá de constituir una reserva energética, el incremento de azúcares observado en las plantas tratadas con 5 g representa un punto de convergencia entre la respuesta fotosintética y las modificaciones metabólicas inducidas por la pulpa de café. Los carbohidratos producidos durante la fotosíntesis constituyen una fuente de carbono y energía para la síntesis de aminoácidos, proteínas y metabolitos secundarios. Asimismo, participan en procesos de señalización celular que pueden modular la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante y la adaptación frente al estrés abiótico (Jeandet et al., 2022).

En conjunto, estos resultados sugieren que la aplicación de pulpa de café favoreció el mantenimiento del metabolismo primario bajo condiciones de elevada irradiancia, reflejado en una mayor acumulación de carbohidratos. Esta respuesta proporciona un marco fisiológico para interpretar los cambios observados posteriormente en proteínas, compuestos fenólicos y flavonoides, ya que estos procesos dependen del suministro de carbono fijado durante la fotosíntesis y de la disponibilidad de energía para sostener las rutas biosintéticas, aunque dichas rutas no fueron evaluadas directamente en este estudio (Sharma et al., 2019).

5.4 Proteínas totales y actividad metabólica vegetal

Las respuestas observadas previamente en pigmentos fotosintéticos y azúcares evidenciaron que la aplicación de pulpa de café se asoció con un mejor mantenimiento del metabolismo del carbono, inferido partiendo de las respuestas observadas en los pigmentos fotosintéticos y los azúcares, particularmente bajo condiciones de elevada irradiancia. Sin embargo, la síntesis de proteínas depende de la integración entre el carbono fijado durante la fotosíntesis y el nitrógeno absorbido por la planta, por lo que el contenido proteico constituye un

indicador del estado funcional del metabolismo primario. Como enzimas, transportadores y componentes estructurales, las proteínas participan prácticamente en todos los procesos celulares (Taiz et al., 2015).

El contenido de proteínas presentó una respuesta diferenciada según del órgano vegetal, la dosis aplicada y la condición de irradiancia (**Figura 19**), observandose una interacción significativa entre estos factores. Este comportamiento sugiere que la mayor disponibilidad de carbono y nitrógeno no se tradujo en una acumulación uniforme de proteínas, sino en una reorganización del metabolismo nitrogenado de acuerdo con las necesidades funcionales de cada tejido.

En las hojas, el contenido de proteínas mostró una respuesta diferencial según la condición lumínica y la dosis aplicada. Bajo condiciones de sombra, el tratamiento con 20 g presentó un incremento significativo en el contenido de proteínas respecto al control, mientras que los demás tratamientos mostraron variaciones de menor magnitud. En contraste, bajo irradiación solar directa no se observaron cambios significativos entre tratamientos. Este comportamiento no necesariamente indica una ausencia de respuesta metabólica, ya que el contenido proteico refleja el balance dinámico entre los procesos de síntesis y degradación de proteínas. En condiciones de estrés lumínico se ha descrito que numerosas proteínas asociadas al aparato fotosintético experimentan un recambio continuo para reemplazar aquellas dañadas por las especies reactivas de oxígeno y mantener la funcionalidad del fotosistema II (Nishiyama et al., 2011). Aunque este proceso no fue evaluado directamente en el presente estudio, constituye un mecanismo potencial que podría contribuir a explicar la estabilidad del contenido proteico foliar observada bajo irradiación solar directa. Además, debido a que el ensayo BCA estima el contenido total de proteínas solubles, los cambios observados reflejan la cantidad global de

proteínas presentes, pero no permiten identificar modificaciones en proteínas específicas ni los procesos de reorganización del proteoma que pueden ocurrir durante la respuesta al estrés (Nelson & Millar., 2015).

En contraste, las raíces mostraron una respuesta mucho más sensible a la aplicación de la pulpa de café. Bajo elevada irradiancia, las dosis de 5 g, 10 g y 20 g disminuyeron significativamente el contenido de proteínas respecto al control, mientras que bajo sombra únicamente la dosis de 5 g produjo un incremento, reduciéndose nuevamente en las dosis superiores. Desde una perspectiva bioquímica, esta respuesta es consistente con el elevado costo energético asociado a la síntesis proteica, proceso que requiere ATP, poder reductor, aminoácidos y esqueletos carbonados provenientes del metabolismo primario (Taiz et al., 2015). En consecuencia, cuando cambian las prioridades fisiológicas de la planta, es posible que la inversión metabólica destinada a la síntesis de proteínas se reorganice entre órganos para favorecer aquellos tejidos con mayor demanda funcional (Taiz et al., 2015).

Esta interpretación concuerda con los cambios observados en el sustrato. Si bien la incorporación de pulpa de café incrementó el contenido de nitrógeno total, este aumento no se tradujo en un incremento generalizado del contenido de proteínas. La dosis de 5 g, que previamente presentó la mayor conservación de los pigmentos fotosintéticos, la mayor acumulación de azúcares y las respuestas morfológicas más favorables, mantuvo relativamente estable el contenido proteico foliar y produjo principalmente cambios en su distribución entre los diferentes órganos vegetales. Esto sugiere que una parte importante del carbono y del nitrógeno disponibles pudo destinarse al crecimiento, al mantenimiento del aparato fotosintético y a otros procesos metabólicos, más que a la acumulación de proteínas solubles. Asimismo, parte del

nitrógeno pudo incorporarse a proteínas estructurales, enzimas específicas o metabolitos nitrogenados que no son cuantificados por el método BCA (Smith et al., 1985; Taiz et al., 2015).

De forma integrada, los resultados evidencian que la pulpa de café no promovió un incremento indiscriminado del contenido de proteínas, sino una respuesta diferencial en su acumulación, dependiente de la dosis, el órgano y las condiciones de irradiancia. Este comportamiento es consistente con el mecanismo de acción propuesto para los bioestimulantes vegetales, los cuales se han asociado con una utilización más eficiente del carbono y del nitrógeno, favoreciendo procesos fisiológicos específicos en lugar de estimular uniformemente la síntesis de biomoléculas (Rouphael & Colla, 2020; Bulgari et al., 2019). En consecuencia, el patrón observado podría reflejar una asignación diferencial de los recursos nitrogenados entre los distintos órganos y procesos fisiológicos, más que un incremento generalizado de proteínas. En conjunto, la dosis de 5 g representó una de las respuestas fisiológicas más consistentes, al coincidir con una mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos y azúcares, así como con un contenido proteico foliar estable. No obstante, este comportamiento debe interpretarse de manera integrada con el resto de las variables evaluadas, considerando que otras dosis, particularmente 20 g, favorecieron en mayor medida algunos parámetros de crecimiento morfológico.

Los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos reportados para tejidos frescos de especies pertenecientes al género *Theobroma* y otras especies leñosas tropicales analizadas mediante ensayos colorimétricos como BCA, considerando las diferencias metodológicas asociadas al protocolo de extracción y al estado fisiológico del tejido (Oliveira da Conceição et al., 1997). Desde esta perspectiva, estos resultados sugieren que la reorganización del metabolismo primario pudo proporcionar la base metabólica para la posterior acumulación de metabolitos secundarios, estableciendo un posible vínculo fisiológico entre el metabolismo del

carbono y del nitrógeno y la respuesta antioxidante descrita en la literatura (Jeandet et al., 2022; Ninkuu et al., 2025), la cual se analiza en la siguiente sección.

5.5 Fenoles y flavonoides en la respuesta antioxidante a la alta irradiancia

Las respuestas observadas previamente en pigmentos fotosintéticos, azúcares y proteínas sugieren que la aplicación de pulpa de café favoreció el mantenimiento del metabolismo primario de las plántulas, particularmente bajo condiciones de alta irradiancia. Sin embargo, la adaptación al estrés no depende únicamente de conservar la fotosíntesis y el crecimiento, sino también de redirigir parte del carbono fijado hacia la síntesis de metabolitos secundarios con función protectora. Entre estos metabolitos, los compuestos fenólicos, particularmente los flavonoides, forman parte de los principales sistemas antioxidantes no enzimáticos de las plantas. Estos compuestos contribuyen a la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS), participan en la absorción de la radiación de alta energía y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis redox celular, funciones ampliamente documentadas para este grupo de metabolitos (Sharma et al., 2019; Kumar et al., 2023).

La biosíntesis de estos metabolitos se encuentra estrechamente relacionada con el metabolismo primario. Los carbohidratos producidos durante la fotosíntesis proporcionan los esqueletos carbonados que ingresan a la vía del shikimato y, posteriormente, a la ruta de los fenilpropanoides, a partir de la cual se sintetiza gran parte de los compuestos fenólicos presentes en las plantas, incluidos los flavonoides (Jeandet et al., 2022; Ninkuu et al., 2025). En consecuencia, las variaciones observadas en estos metabolitos permiten inferir cómo las mejoras registradas en el aparato fotosintético y en el metabolismo del carbono podrían haberse asociado con respuestas de defensa frente a la alta irradiancia.

Los resultados muestran que la respuesta de los metabolitos fenólicos dependió simultáneamente del órgano evaluado, la dosis aplicada y la condición lumínica (**Figura 20**). Bajo irradiación solar directa, las hojas tratadas con 5 g presentaron las mayores concentraciones de fenoles y flavonoides, mientras que bajo sombra la acumulación tendió a concentrarse en las raíces. Este comportamiento sugiere que la posible redistribución del carbono hacia el metabolismo secundario estuvo condicionada por las necesidades fisiológicas de cada tejido.

La mayor acumulación de fenoles y flavonoides en las hojas bajo elevada irradiancia fue consistente con el patrón observado previamente para los pigmentos fotosintéticos y los azúcares. La conservación del aparato fotosintético podría haber favorecido el mantenimiento de un suministro más estable de fotoasimilados para alimentar la vía de los fenilpropanoides, donde la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) regula la formación de una amplia diversidad de compuestos fenólicos con funciones antioxidantes y fotoprotectoras (Sharma et al., 2019; Ninkuu et al., 2025). Aunque la actividad de esta enzima no fue determinada en el presente estudio, el incremento simultáneo de azúcares, fenoles y flavonoides observado con la dosis de 5 g es compatible con una mayor disponibilidad de carbono para la biosíntesis de metabolitos secundarios.

Esta relación explica también el comportamiento semejante entre fenoles y flavonoides. Dado que los flavonoides corresponden a un grupo específico de compuestos fenólicos derivados de la vía de los fenilpropanoides, es esperable que ambos metabolitos respondan de manera similar frente a cambios en esta ruta biosintética (Sharma et al., 2019). Asimismo, las concentraciones de flavonoides fueron sistemáticamente inferiores a las de fenoles totales, comportamiento consistente con su relación biosintética y con lo reportado para especies del

género *Theobroma*, cuyos fenoles incluyen además ácidos fenólicos, taninos y otros metabolitos no flavonoides (Galeano y Paladines., 2012; Carmona et al., 2021).

La distribución diferencial entre hojas y raíces refleja las funciones fisiológicas de cada órgano. Bajo elevada irradiancia, las hojas constituyen el principal sitio de absorción de energía y, por tanto, el tejido con mayor riesgo de fotoinhibición y formación de ROS. En consecuencia, es esperable que la síntesis y acumulación de metabolitos fenólicos ocurra preferentemente en este órgano, donde la literatura les atribuye funciones relacionadas con la neutralización de radicales libres y la fotoprotección (Kumar et al., 2023; Sharma et al., 2019). En contraste, bajo sombra las raíces presentaron concentraciones superiores de fenoles y, en menor medida, de flavonoides. Dado que este órgano no está expuesto directamente a la radiación, la acumulación de estos metabolitos probablemente podría estar relacionada con funciones asociadas a la defensa frente a microorganismos, la regulación de la rizósfera, la lignificación y el crecimiento radical, además de contribuir al mantenimiento de una reserva de capacidad antioxidante (Jeandet et al., 2022; Sharma et al., 2019).

Resulta igualmente significativo que únicamente la dosis de 5 g incrementara de forma consistente los fenoles y flavonoides foliares. Este comportamiento coincide con el patrón descrito para los pigmentos fotosintéticos y los azúcares, reforzando la idea de que esta dosis promovió una de las respuestas fisiológicas más consistentes entre las variables bioquímicas evaluadas. Sin embargo, este comportamiento debe interpretarse de manera integrada con el resto de los resultados, considerando que otras dosis, particularmente 20 g, favorecieron en mayor medida algunas variables de crecimiento morfológico.

La acumulación de fenoles y flavonoides también puede interpretarse a partir de la interacción entre los metabolismos del carbono y del nitrógeno. Mientras el nitrógeno favorece la

síntesis de aminoácidos y proteínas, una mayor disponibilidad relativa de carbono puede estimular la producción de metabolitos secundarios derivados de la vía de los fenilpropanoides (Sharma et al., 2019; Jeandet et al., 2022). En este estudio, si bien la incorporación de pulpa de café incrementó el contenido de nitrógeno en el suelo, este aumento no se reflejó en un incremento generalizado de la concentración de proteínas en las plantas. En cambio, la dosis de 5 g favoreció simultáneamente una mayor acumulación de azúcares y de compuestos fenólicos, lo que sugiere una reorganización metabólica en la que parte del carbono fijado mediante la fotosíntesis podría haber sido redirigido hacia mecanismos de defensa antioxidante. Esta posible reorganización metabólica también ayuda a explicar por qué solo algunas comparaciones fueron estadísticamente significativas, ya que la síntesis de metabolitos secundarios depende del balance dinámico entre crecimiento, mantenimiento y defensa.

En conjunto, los resultados sugieren que la aplicación de pulpa de café promovió una reorganización del metabolismo secundario dependiente de la dosis y de las condiciones de irradiancia. Debe considerarse que las determinaciones de fenoles y flavonoides en hojas se realizaron con base en peso fresco, mientras que en raíces se expresaron respecto al peso seco; por tanto, los valores absolutos entre órganos no son directamente comparables y la interpretación debe realizarse considerando las tendencias observadas dentro de cada tejido.

La mayor acumulación de estos metabolitos en las hojas tratadas con 5 g fue consistente con la conservación de los pigmentos fotosintéticos, la mayor disponibilidad de azúcares y el mantenimiento del metabolismo proteico discutidos previamente, lo que es consistente con una respuesta fisiológica integrada frente a la alta irradiancia. Aunque en este estudio no se determinaron directamente la actividad antioxidante, la producción de ROS, ni la actividad de enzimas como PAL, ni la de otras enzimas antioxidantes, la integración de la evidencia obtenida

es consistente con una posible coordinación entre metabolismo primario y secundario. En este contexto, los mecanismos discutidos constituyen una interpretación fisiológica sustentada en la literatura y proporcionan un marco conceptual para comprender el potencial bioestimulante de la pulpa de café durante el establecimiento de *Theobroma grandiflorum*, más que una demostración experimental de dichos procesos.

5.6 Integración de las respuestas bioquímicas y del crecimiento inducidas por la pulpa de café

La integración de los resultados sugiere que los efectos de la pulpa de café sobre las plántulas de *Theobroma grandiflorum* no pueden explicarse únicamente por el incremento de la fertilidad del suelo. Aunque la incorporación del residuo modificó favorablemente algunas propiedades fisicoquímicas, como el contenido de carbono orgánico, nitrógeno total, capacidad de intercambio catiónico y disponibilidad de determinados nutrientes, las respuestas fisiológicas y bioquímicas no mostraron una relación proporcional con estos cambios. Las dosis de 10 y 20 g generaron modificaciones más marcadas en las propiedades del sustrato; no obstante, la dosis de 5 g presentó una respuesta fisiológica y bioquímica más consistente, mientras que la dosis de 20 g favoreció en mayor medida algunas variables relacionadas con el crecimiento morfológico. Este comportamiento indica que la pulpa actuó simultáneamente como enmienda orgánica y bioestimulante, ya que, además del aporte nutricional, es consistente con una regulación fisiológica dependiente de la dosis aplicada y del estado metabólico de la planta, comportamiento característico de este tipo de insumos (Rouphael & Colla., 2020; Bulgari et al., 2019).

El conjunto de las variables evaluadas permite proponer una secuencia fisiológica integrada que explica el patrón observado durante el experimento. Inicialmente, las mejoras en las propiedades del suelo podrían haber favorecido el desarrollo del sistema radicular y la

absorción de agua y nutrientes. Sobre esta base nutricional, las plantas presentaron una mayor conservación de la estabilidad del aparato fotosintético bajo elevada irradiancia, evidenciada por el mantenimiento de clorofilas y carotenoides. En este contexto, la conservación de los pigmentos fotosintéticos fue consistente con una mayor acumulación de azúcares foliares, lo que podría reflejar un mejor mantenimiento del metabolismo del carbono, tanto para el crecimiento como para la biosíntesis de metabolitos fenólicos a través de las vías del shikimato y los fenilpropanoides. Paralelamente, el comportamiento de las proteínas sugiere que este proceso no implicó una acumulación indiscriminada de biomoléculas, sino una reorganización del metabolismo del carbono y del nitrógeno acorde con las demandas funcionales de cada órgano. En conjunto, estos resultados permiten proponer que las respuestas morfológicas constituyeron la manifestación final de una serie de ajustes bioquímicos iniciados por las modificaciones del suelo e interpretados a partir de la integración del metabolismo primario y secundario.

La respuesta diferencial entre las dosis aplicadas refuerza esta interpretación. La dosis de 5 g presentó una de las respuestas fisiológicas más consistentes entre las variables bioquímicas evaluadas, mientras que la dosis de 20 g favoreció algunos parámetros de crecimiento como el área foliar y el número de hojas. En contraste, la dosis de 10 g mostró un comportamiento menos consistente, evidenciado por una menor respuesta en algunas variables morfológicas y fisiológicas respecto a las otras dosis evaluadas. Aunque este resultado representa una desviación de la tendencia general observada, durante el desarrollo del experimento no se identificaron diferencias en el manejo de las unidades experimentales que permitieran atribuir este comportamiento a factores metodológicos. La distribución de las plantas se realizó de manera aleatorizada, todas las unidades experimentales recibieron las mismas condiciones de riego y manejo agronómico, y adicionalmente se efectuó una rotación periódica de las plantas para

minimizar posibles efectos de borde relacionados con la ubicación dentro de las áreas de cultivo. En consecuencia, la respuesta observada para la dosis de 10 g se interpreta como una variación propia del tratamiento, cuya causa no pudo establecerse con el presente diseño experimental y que deberá ser evaluada en estudios posteriores con un mayor número de dosis y réplicas experimentales.

Este comportamiento probablemente refleja un equilibrio entre disponibilidad de nutrientes y regulación metabólica. Aunque las dosis más altas incrementaron la fertilidad del sustrato, también promovieron cambios en el pH y en el balance entre cationes, reduciendo potencialmente la disponibilidad de micronutrientes esenciales para el funcionamiento fotosintético y el metabolismo celular. En consecuencia, la respuesta observada es compatible con los patrones dosis-respuesta descritos para diversos bioestimulantes de origen biológico, en los que la magnitud del efecto depende de la dosis aplicada (Vargas et al., 2017; Rouphael & Colla., 2020). No obstante, debido a que el presente estudio únicamente evaluó cuatro niveles de aplicación y la respuesta de la dosis intermedia no siguió un patrón uniforme entre todas las variables analizadas, los resultados no permiten demostrar formalmente un fenómeno de hormesis. Por tanto, el comportamiento observado debe interpretarse como una respuesta no lineal dependiente de la dosis y no como evidencia concluyente de una relación hormética. En este sentido, la evidencia obtenida es consistente con la existencia de una dosis fisiológicamente favorable, determinada por el equilibrio entre el mejoramiento de las propiedades del suelo y la capacidad de la planta para utilizar eficientemente los recursos disponibles.

La condición lumínica también desempeñó un papel determinante en la expresión del efecto bioestimulante. Bajo sombra, donde la presión fotooxidativa fue menor, las diferencias entre tratamientos resultaron limitadas y las respuestas metabólicas tendieron a concentrarse en

el sistema radicular. En contraste, bajo irradiación solar directa la aplicación de pulpa de café se asoció con una respuesta coordinada que involucró la conservación del aparato fotosintético, una mayor disponibilidad de carbohidratos y la acumulación de fenoles y flavonoides en las hojas, órganos directamente expuestos al exceso de radiación. Este es consistente con la hipótesis de que la pulpa expresó sus mayores beneficios cuando las plantas enfrentaron condiciones de estrés, sugiriendo un posible rol como modulador de la tolerancia fisiológica y no como un simple promotor del crecimiento, en concordancia con el mecanismo de acción actualmente atribuido a los bioestimulantes vegetales (Van Oosten et al., 2017; Zhang et al., 2024).

Esta interpretación también encuentra respaldo en los análisis integradores realizados. El mapa de calor (**Figura 21**) evidenció que la dosis de 5 g concentró el mayor número de respuestas positivas bajo irradiación directa, mientras que la red de correlaciones (**Figura 22**) mostró agrupamientos claramente definidos entre las variables de crecimiento, los pigmentos fotosintéticos y los metabolitos fenólicos. Estos patrones sugieren que las respuestas observadas son consistentes con un ajuste fisiológico coordinado. La ausencia de correlaciones fuertes para carbohidratos y proteínas probablemente refleja la naturaleza dinámica de estos metabolitos, cuyas concentraciones dependen de procesos continuos de síntesis, utilización y redistribución, por lo que su comportamiento no necesariamente mantiene relaciones lineales con otras variables fisiológicas.

En conjunto, la evidencia obtenida sugiere que los efectos observados de la pulpa de café son consistentes con un mecanismo de acción que combina efectos de fertilización y bioestimulación. Las modificaciones fisicoquímicas del suelo representaron el inicio de una serie de respuestas que pudieron favorecer el desarrollo radical, la conservación del aparato fotosintético, el mantenimiento del metabolismo primario y una posible reorganización del

metabolismo secundario antioxidante, lo que podría haber contribuido a mejorar la adaptación fisiológica de las plántulas frente a la alta irradiancia. En conjunto, la dosis de 5 g representó la condición de mayor equilibrio fisiológico al optimizar simultáneamente estos procesos sin inducir los desbalances observados en las dosis superiores. De esta manera, los resultados obtenidos evidencian que la valorización de la pulpa de café trasciende su función como fuente de nutrientes, al presentar efectos que pueden extenderse a la modificación de las propiedades del suelo y a la regulación de procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas, respaldando su potencial como un bioestimulante de origen agroindustrial con potencial para fortalecer el establecimiento de especies amazónicas como *Theobroma grandiflorum*, contribuyendo además al aprovechamiento sostenible de los residuos generados por la actividad cafetera, dentro de los principios de la economía circular.

6. Conclusiones

La presente investigación evidenció que la aplicación de pulpa de café produjo cambios significativos en la interacción suelo-planta de las plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*), cumpliendo el objetivo general de evaluar su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo, el crecimiento y la respuesta bioquímica de las plantas bajo diferentes condiciones de irradiancia. De manera integrada, la evidencia obtenida sugiere que este residuo agroindustrial posee el potencial de actuar como enmienda orgánica y bioestimulante, al promover respuestas que trascendieron el simple aporte de nutrientes.

La caracterización del suelo evidenció que la incorporación de pulpa de café favoreció el aumento del pH, la materia orgánica, el carbono orgánico, el nitrógeno total y la capacidad de intercambio catiónico, además de incrementar la disponibilidad de nutrientes, particularmente de

potasio, contribuyendo a mejorar las condiciones de fertilidad del sustrato. No obstante, las dosis más elevadas también generaron modificaciones en el equilibrio químico del suelo, como la disminución de la disponibilidad de hierro y alteraciones en las relaciones catiónicas, lo que evidencia que un mayor enriquecimiento nutricional no necesariamente se traduce en una mayor eficiencia fisiológica de las plantas.

La evaluación de las variables morfológicas evidenció que las mejoras edáficas se asociaron con un mejor establecimiento de las plántulas, especialmente a través del desarrollo del sistema radical y la acumulación de biomasa. Sin embargo, la magnitud de esta respuesta dependió tanto de la dosis aplicada como de la condición lumínica, siendo la irradiación solar directa el escenario donde los efectos de la pulpa de café fueron más evidentes, lo que sugiere que su acción estuvo asociada principalmente a la modulación de la respuesta al estrés y no únicamente a la nutrición vegetal.

El análisis bioquímico evidenció una respuesta fisiológica integrada. Bajo condiciones de alta irradiancia, la pulpa de café se asoció con la conservación de los pigmentos fotosintéticos, incrementó la acumulación de azúcares, sugirió una reorganización del metabolismo proteico y se asoció con una mayor acumulación de fenoles y flavonoides. La integración de estas respuestas sugiere una interacción entre el metabolismo primario y secundario compatible con una respuesta fisiológica coordinada frente a la alta irradiancia.

Entre las dosis evaluadas, la aplicación de 5 g presentó una de las respuestas fisiológicas y bioquímicas más consistentes, particularmente en pigmentos fotosintéticos, carbohidratos y metabolitos fenólicos. No obstante, la dosis de 20 g favoreció en mayor medida algunas variables morfológicas, lo que indica que la respuesta a la pulpa de café dependió de la variable evaluada.

La integración de las variables edáficas, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas permitió proponer una secuencia funcional en la que las modificaciones del suelo podrían haber favorecido el desarrollo radical y la absorción de nutrientes, asociándose con el mantenimiento del aparato fotosintético, el metabolismo primario y la posible reorganización del metabolismo secundario antioxidante. Esta secuencia podría explicar de manera consistente cómo los cambios inducidos por la pulpa de café se tradujeron en una mayor capacidad de adaptación de las plántulas frente a la alta irradiancia.

Finalmente, esta investigación aporta evidencia experimental sobre el uso de la pulpa de café como una alternativa para la valorización sostenible de los residuos generados por la agroindustria cafetera. Asimismo, contribuye al conocimiento de las respuestas edáficas, morfológicas y bioquímicas asociadas con su aplicación durante el establecimiento de *Theobroma grandiflorum*, una especie amazónica sobre la cual aún existe información científica limitada. Los resultados obtenidos proporcionan una base para futuras investigaciones enfocadas en validar los mecanismos fisiológicos y moleculares planteados, así como en evaluar los efectos de la pulpa de café durante etapas posteriores del desarrollo del cultivo y bajo condiciones de campo. De este modo, se respalda su potencial como alternativa dentro de estrategias orientadas a la agricultura sostenible y al aprovechamiento de residuos bajo un enfoque de economía circular.

7. Recomendaciones

Se recomienda desarrollar estudios de mayor duración que permitan evaluar la persistencia de los efectos observados durante etapas más avanzadas del desarrollo de *Theobroma grandiflorum*, incluyendo las etapas de establecimiento en campo y producción,

mediante la evaluación de variables relacionadas con el rendimiento y la calidad del fruto. Esto permitirá establecer si las mejoras observadas en el crecimiento, el metabolismo vegetal y las propiedades fisicoquímicas del suelo se mantienen a largo plazo y se reflejan en una mayor productividad y desempeño agronómico del cultivo.

Con el propósito de profundizar en los mecanismos fisiológicos propuestos en esta investigación, se recomienda complementar futuras evaluaciones con la determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS), actividad de enzimas antioxidantes (como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas), capacidad antioxidante total y expresión o actividad de enzimas clave del metabolismo fenólico, particularmente fenilalanina amonio-liasa (PAL). Estos análisis permitirían corroborar experimentalmente los mecanismos bioquímicos inferidos durante la discusión.

Se recomienda validar estos resultados bajo condiciones de campo y en diferentes tipos de suelo representativos de las regiones productoras de copoazú. La evaluación en distintos contextos edáficos y ambientales permitirá determinar la estabilidad de la respuesta observada, así como la influencia de factores como la microbiota del suelo, la dinámica natural de nutrientes y las condiciones climáticas sobre la eficacia de la pulpa de café como bioestimulante.

Finalmente, se recomienda ampliar la evaluación agronómica, ambiental y económica del uso de la pulpa de café, considerando no solo sus efectos sobre el crecimiento y la respuesta fisiológica de las plantas, sino también su contribución a la calidad del suelo, al aprovechamiento de residuos agroindustriales y a la viabilidad de su incorporación en sistemas productivos de la región amazónica. Este enfoque contribuirá a fortalecer las bases científicas para su incorporación dentro de estrategias de agricultura sostenible y economía circular.

Referencias Bibliográficas

- Aguilar, C. M., y Quintanilla, A. W. (2018). Caracterización morfológica y fisiológica de los ecotipos de cacao forastero y trinitario (*Theobroma cacao L.*), en su desarrollo durante la fase de vivero, año 2017 [Tesis de licenciatura, Universidad de El Salvador]. Repositorio Institucional MINEDUCYT. <https://hdl.handle.net/20.500.14492/21238>.
- Ainsworth, E., & Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2(4), 875–877 <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>.
- Alves, R. C., Rodríguez, F., Nunes, M. A., Vinha, A. F., & 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-byproducts/galanakis/978-0-12-811290-8>.
- Avendaño, A. C., Cueto M., J., Mendoza L., A., López A., P., Sandoval E., A., y Aguirre M., J. (2014). Manual gráfico de descriptores varietales de cacao (*Theobroma cacao L.*). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Rosario Izapa. <https://www.gob.mx/snics>.
- Ayala, M. D., Valdés, V. E., Benedicto, V. G., Escamilla, P. E., Sánchez, H. R., Gallardo, J. F., & Martínez, Z. P. (2022). Soil biological activity, carbon and nitrogen dynamics in modified coffee agroforestry systems in Mexico. *Agronomy*, 12(8), 1794. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081794>.

- Banguero, G. Y., Mosquera, F. G., Toro, G. S., Leiva, R. E., y Ramírez, P. R. (2015). Respuesta fisiológica de plántulas de cacao (*Theobroma cacao L*) sometidas a sombreamiento y a la aplicación de una enmienda orgánica. *Bioetnia*, 12, 52-59.
- Barrow, N. J., & Hartemink, A. E. (2023). The effects of pH on nutrient availability depend on both soils and plants. *Plant and Soil*, 487(1-2), 21-37. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-05960-5>.
- Birhane, E., Gebrewahid, H., & Raj, A. J. (2014). Experimental designs in agroforestry research. In A. J. Raj & S. B. Lal (Eds.), *Agroforestry: Theory and practices* (pp. 818–831). Scientific Publishers.
- Bomfim, A. S., Oliveira, D. M., Walling, E., Babin, A., Hersant, G., Vaneeckhaute, C., Dumont, M. J & Rodrigue, D. (2023). Spent Coffee Grounds Characterization and Reuse in Composting and Soil Amendment. *Waste*, 1(1), 2-20. <https://doi.org/10.3390/waste1010002>.
- Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, 9(6), 306. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>.
- Buthelezi, N. M., Mugivhisa, L. L., & Gololo, S. S. (2024). Foliar application of moringa seed extract alone or in combination with salicylic acid enhanced growth, bioactive, and phytohormone compositions of cancer bush plants under heat stress. *HortScience*, 59(5), 587–594. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI17691-24>.
- Campos, R. J., Aguayo, F. M., Mendoza, N. A., Acosta, B. A., y Paucar, M, L. (2021). Copoazú (*Theobroma grandiflorum*): Caracterización botánica, composición nutricional, actividad

- antioxidante y compuestos bioactivos. *Agroindustrial Science*, 11(3), 339–343.
<https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2021.03.11>.
- Carmona, H. J., Le, M., Idárraga, M. A., & González, C. H. (2021). Flavonoid/polyphenol ratio in *Mauritia flexuosa* and *Theobroma grandiflorum* as an indicator of effective antioxidant action. *Molecules*, 26(21), 6431. <https://doi.org/10.3390/molecules26216431>.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>.
- Cuesta, P. D., Montenegro, M. C., Correa, M., Rosano, O., & Ortega, L. (2025). Impact of Compost Produced with Coffee Pulp and *Hermetia Illucens* on Tomato Plant Growth. *Chemical Engineering Transactions*, 117, 613–618.
<https://doi.org/10.3303/CET25117103>.
- Demmig-Adams. B., & Adams, W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1(1), 21–26.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80019-7).
- Di Sario, L., Boeri, P., Matus, J. T., & Pizzio, G. A. (2025). Plant biostimulants to enhance abiotic stress resilience in crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(3), 1129. <https://doi.org/10.3390/ijms26031129>.
- Escobar, A. C. J., Criollo, C. D., y Herrera, W. (2009). Copoazú (*Theobroma grandiflorum*, Willd. ex Spreng Schum): Variabilidad y manejo del cultivo en el piedemonte amazónico. Corpoica.
- European Union. (2019). Regulation (EU) 2019/1009 of the European Parliament and of the Council of 5 June 2019 laying down rules on the making available on the market of EU

- fertilising products. Official Journal of the European Union, L 170, 1–114.
<http://data.europa.eu/eli/reg/2019/1009/oj>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). Soil water content: gravimetric method (Physical Properties. Exercise P06b; Reference poster no. 4; Global Soil Doctors Programme) [Reference poster].
https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/GSP/GSDP/Field_exercises/NEW_Field_exercises/P06b-gravimetric-soil-water-EN-1-2.pdf.
- Galeano, G. P., y Paladines B., M. (2012). Actividad antioxidante de extractos metanólicos de granos de copoazú (*Theobroma grandiflorum*). *Vitae*, 19(Supl. 1), S436–S438.
- Ghasemi, A., & Zahediasl, S. (2012). Normality tests for statistical analysis: A guide for non-statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 10(2), 486–489.
<https://doi.org/10.5812/ijem.3505>.
- Hartung, J., Wagener, J., Ruser, R., & Piepho, H. P. (2019). Blocking and re-arrangement of pots in greenhouse experiments: Which approach is more effective? *Plant Methods*, 15, 143.
<https://doi.org/10.1186/s13007-019-0527-4>.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. *Plant and Soil*, 237(2), 173–195.
<https://doi.org/10.1023/A:1013351617532>.
- Jeandet, P., Formela, L. M., Labudda, M., & Morkunas, I. (2022). The role of sugars in plant responses to stress and their regulatory function during development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5161. <https://doi.org/10.3390/ijms23095161>.

- Krakowska, S. A., Kielbasa, A., Rafińska, K., Ligor, M., & Buszewski, B. (2022). Modern methods of pre-treatment of plant material for the extraction of bioactive compounds. *Molecules*, 27(3), 730. <https://doi.org/10.3390/molecules27030730>.
- Kumar, K., Debnath, P., Singh, S., & Kumar, N. (2023). An overview of plant phenolics and their involvement in abiotic stress tolerance. *Stresses*, 3, 570–585. <https://doi.org/10.3390/stresses3030040>.
- Lee, Y. G., Cho, E. J., Maskey, S., Nguyen, D. T., & Bae, H. J. (2023). Value-added products from coffee waste: A review. *Molecules*, 28(8), 3562. <https://doi.org/10.3390/molecules28083562>.
- Li, W., & Keller, A. A. (2023). Optimization of targeted plant proteomics using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *ACS Agricultural Science & Technology*, 3(5), 421–431. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.3c00017>.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In L. Packer, R. Douce (Eds.), *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350–382). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).
- López, A. D., Murillo, A. B., Rosas, M. B., y Valle, M. G. (2002). Manual de análisis químicos de suelos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). <http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/2065>.
- Martínez, A. S., Hernández, C. F., Aguilar, G. C., y Rodríguez, H. (2019). Extractos de pulpa de café: Una revisión sobre antioxidantes polifenólicos y su actividad antimicrobiana. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 27(77), 73–79.

- Martínez, L. S., Martí, G. J., Pedreño, M. Á., Almagro, L., & Sabater, J. A. (2024). Higher plant-derived biostimulants: Mechanisms of action and their role in mitigating plant abiotic stress. *Antioxidants*, 13(318). <https://doi.org/10.3390/antiox13020318>.
- Martínez, S. F., Menéndez, G. M., y Álvarez, G. M. A. (2014). Descriptores mínimos para la caracterización morfoagronómica de cacao (*Theobroma cacao* Lin.). *Café Cacao*, 13(1), 11-19. <https://cafecacao.edicionescervantes.com/index.php/cafecacao/article/view/84>.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez A. G., Montañez, S. J., Aguilar, N. A., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review, *Biotechnology Advances*, 29(3), 365-373, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>.
- Mikulášek, K., Konečná, H., Potěšil, D., Holánková, R., Havliš, J., & Zdráhal, Z. (2021). SP3 protocol for proteomic plant sample preparation prior LC-MS/MS. *Frontiers in Plant Science*, 12, 635550. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.635550>.
- Montero M, G., Barrera G, A., Giraldo B., y Lucena M, A. (2016). Copoazú: Fichas técnicas de especies de uso forestal y agroforestal de la Amazonia colombiana (Ficha No. 27) [Ficha técnica]. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. https://www.sinchi.org.co/files/PUBLICACIONES%20DIGITALES/Fichas%20Tecnicas%20agroforestal/Fichas%20Tecnicas%20de%20Especies%20de%20uso%20Forestal%20y%20Agroforestal%20de%20la%20Amazonia%20Colombiana_27%20COPPOAZU.pdf.
- 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(5), 661–672. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z>.

- Nelson, C. J., & Millar, A. H. (2015). Protein turnover in plant biology. *Nature Plants*, *1*, 15017. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.17>.
- Ninkuu, V., Aluko, O. O., Yan, J., Zeng, H., Liu, G., Zhao, J., Li, H., Chen, S., & Dakora, F. D. (2025). Phenylpropanoids metabolism: Recent insight into stress tolerance and plant development cues. *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1571825. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1571825>.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., & Murata, N. (2011). Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiologia Plantarum*, *142*(1), 35–46. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01457.x>.
- Oliveira da Conceição, H. E., Mazzafera, P., Rocha, N. O., & Benchimol, S. R. (1997). Biochemical composition of *Theobroma grandiflorum* leaves infected by *Crinipellis pernicioso*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, *9*(2), 135–138.
- Poorter, H., Niklas, K. J., Reich, P. B., Oleksyn, J., Poot, P., & Mommer, L. (2012). Biomass allocation to leaves, stems and roots: Meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist*, *193*(1), 30–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03952.x>.
- Rao, M., & Zheng, B. (2025). The role of polyphenols in abiotic stress tolerance and their antioxidant properties to scavenge reactive oxygen species and free radicals. *Antioxidants*, *14*, 74. <https://doi.org/10.3390/antiox14010074>.
- Rodríguez, C. A., & Hernández, C. M. (2025). Amazonian fruits in Colombia: Exploring bioactive compounds and their promising role in functional food innovation. *Journal of Food Composition and Analysis*, *137*, 106878. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106878>.

- Rodríguez, L., Suárez, J. C., Pulleman, M., Guaca, L., Rico, A., Romero, M., Quintero, M., & Lavelle, P. (2021). Agroforestry systems in the Colombian Amazon improve the provision of soil ecosystem services. *Applied Soil Ecology*, 164, 103933. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103933>.
- Rodríguez, R. D. (2021). Estudio del aprovechamiento de los residuos del café como potencial producto fitosanitario, bioestimulante y/o fertilizante (Trabajo de Fin de Grado). Universidad da Coruña.
- Rogez, H., Buxant, R., Mignolet, E., Souza, J. N. S., Silva, E. M., & Larondelle, Y. (2004). Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: Araza-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuazu (*Theobroma grandiflorum*). *European Food Research and Technology*. 218 (4), 380–384. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0853-6>.
- Rosa, J. S. da., Oliveira, M, P. I., Carvalho, A. V., & Freitas, S. (2024). Cupuassu Fruit, a Non-Timber Forest Product in Sustainable Bioeconomy of the Amazon—A Mini Review. *Processes*, 12(7), 1353. <https://doi.org/10.3390/pr12071353>.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., Gonzalez, J. A., Hilal, M., & Prado, F. E. (2009). Soluble sugars-Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(5), 388-393. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8294>.
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2020). Editorial: Biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 11, 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>.

- Saddhe, A., Manuka, R., & Penna, S. (2021). Plant sugars: Homeostasis and transport under abiotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 171(4), 739-755. <https://doi.org/10.1111/ppl.13283>.
- Salazar, J. C., Muñoz, L. M., Durán, B. E. H., Di Rienzo, J. A., & Casanoves, F. (2018). Non-destructive estimation of the leaf weight and leaf area in cacao (*Theobroma cacao* L). *Scientia Horticulturae*, 229, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.034>.
- Sánchez, R. A., Ávila, P. E., Lombardini, L., & Restrepo, D. H. (2023). The application of coffee pulp biochar improves the physical, chemical, and biological characteristics of soil for coffee cultivation. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23, 2512-2524. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01208-4>.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Serna, J. J., Torres, V. L., Martínez, C. K., & Hernández, S. M. (2018). Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. *Revista ION*, 31(1), 37–42. <https://doi.org/10.18273/revion.v31n1-2018006>.
- Sery, D. J., Tokpa, L. Z., Gba, K., Ohoueu, E. J., Seri, T. C., & Konan, A. (2025). Coffee pulp and husk residue compost improve the growth of Robusta coffee (*Coffea canephora*) seedlings in the nursery. *Indian Journal of Agricultural Research*, 59(5), 791-796. <https://doi.org/10.18805/IJARE.AF-891>.
- Shahzad, Z., & Amtmann, A. (2017). Food for thought: How nutrients regulate root system architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.06.008>.

- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>.
- Sparks, D. L. (Ed.). (1996). Methods of Soil Analysis. Part 3: Chemical Methods (SSSA Book Series No. 5). *Soil Science Society of America*. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3>.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). Plant physiology and development (6th ed.). *Sinauer Associates*.
- Takahashi, S., & Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*, 13(4), 178-182. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.005>.
- Takala, B. (2021). Utilization of coffee husk and pulp waste as soil amendment: A review. *Journal of Natural Sciences Research*, 12(11), 10-16. <https://doi.org/10.7176/JNSR/12-11-02>.
- Tapia, M. S., Alzamora, S. M., & Chirife, J. (2020). Effects of Water Activity (a_w) on Microbial Stability as a Hurdle in Food Preservation. In Water Activity in Foods (eds G.V. Barbosa-Cánovas, A.J. Fontana, S.J. Schmidt and T.P. Labuza), *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications* (2nd ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch14>.
- Thermo Scientific. (2020). Pierce™ BCA protein assay kit user guide (Pub. No. MAN0011430 Rev. C00). *Thermo Fisher Scientific*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>.

- Torres, V. L. S., Martínez, K. G., Serna, J. J. A., y Hernández, M. C. (2019). Secado de pulpa de café: Condiciones de proceso, modelación matemática y efecto sobre propiedades físicoquímicas. *Información Tecnológica*, 30(2), 189–200. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000200189>.
- Tränkner, M., Tavakol, E., & Jákli, B. (2018). Functioning of potassium and magnesium in photosynthesis, photosynthate translocation and photoprotection. *Physiologia Plantarum*, 163(3), 414-431. <https://doi.org/10.1111/ppl.12747>.
- Tratado de Cooperación Amazónica; FAO. (1999). Manual técnico sobre cultivo y utilización del copoazú (*Theobroma grandiflorum*). Secretaría Pro Tempore del Tratado de Cooperación Amazónica y Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
- Van Oosten, M. J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., & Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>.
- Vargas, H. M., Macias, B. I., Guevara, G R., Romero, G. S., Rico, G. E., Ocampo, V. R., Álvarez, A. L., & Torres, P. I. (2017). Plant hormesis management with biostimulants of biotic origin in agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1762. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01762>.
- Velásquez, G. A. B., Londoño, S F., y Rojas, P. O. (2021). Priorización de alternativas productivas y diagnóstico del mercado agropecuario para el departamento de Caquetá: Guía mercado de productos agropecuarios, guía para priorización y diagnóstico. Unidad de Planificación Rural Agropecuaria (UPRA). <https://www.upra.gov.co>.

- Velásquez, V. P. A., Castro, Z. M. I., Rodríguez, C. H. A., Castro, D., Arbelaez, L., & Zambrano, J. C. (2025). Exploring *Theobroma grandiflorum* diversity to improve sustainability in smallholdings across Caquetá, Colombia. *Italian Journal of Agronomy*, 20, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.ijagro.2025.100034>.
- Vitale, E., Velikova, V., Tsonev, T., Ferrandino, I., Capriello, T., Simoniello, P., Kostadinov, K., Arena, C., & De Pinto, M. C. (2021). The interplay between light quality and biostimulant application affects the antioxidant capacity and photosynthetic traits of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Plants*, 10(5), 861. <https://doi.org/10.3390/plants10050861>.
- Wobbrock, J. O., Findlater, L., Gergle, D., & Higgins, J. J. (2011). The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only ANOVA procedures. *Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems*, 143–146. <https://doi.org/10.1145/1978942.1978963>.
- Wu, W., Chen, L., Liang, R., Huang, S., Li, X., Huang, W., Luo, Q., Zhang, D., Wang, R., & Zhu, J. (2025). The role of light in regulating plant growth, development and sugar metabolism: A review. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1507628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1507628>.
- Yang, Y., Tilman, D., Jin, Z., Smith, P., Barrett, C. B., Zhu, Y. G., Burney, J., D’Odorico, P., Fantke, P., Fargione, J., Finlay, J. C., Rulli, M. C., Sloat, L., van Groenigen, K. J., West, P. C., Ziska, L., Michalak, A. M., Lobell, D. B., Clark, M., Colquhoun, J., & Clim-Ag Team. (2024). Climate change exacerbates the environmental impacts of agriculture. *Science*, 385(6713), Article eadn3747. <https://doi.org/10.1126/science.adn3747>.

- Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, 57(3), 508–514. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>.
- Zagoskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in plants: Structure, biosynthesis, abiotic stress regulation, and practical applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>.
- Zhang, X., & Schmidt, R. (1997). The impact of growth regulators on α -tocopherol status in *Poa pratensis* L. under water stress. *International Turfgrass Society Research Journal*, 8, 1364–2137.
- Zhang, X., Yin, J., Ma, Y., Peng, Y., Fenton, O., Wang, W., Zhang, W., & Chen, Q. (2024). Unlocking the potential of biostimulants derived from organic waste and by-product sources: Improving plant growth and tolerance to abiotic stresses in agriculture. *Environmental Technology & Innovation*, 34, 103571. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103571>.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).
- Zoca, S. M., Penn, C. J., Rosolem, C. A., Alves, A. R., Neto, L. O., & Martins, M. M. (2014). Coffee processing residues as a soil potassium amendment. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 3, 155-165. <https://doi.org/10.1007/s40093-014-0078-7>.

Zuorro, A., & Lavecchia R. (2012). Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy, *Journal of Cleaner Production*, 34, 49-56.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.003>.

Apéndices

Apéndice 1.

Hojas de referencia utilizadas para la determinación de la constante k empleada en el cálculo del área foliar de plántulas de copoazú



Nota. Se seleccionaron aleatoriamente 14 hojas de plántulas de copoazú cultivadas en invernadero, incluyendo hojas en diferentes estados de desarrollo, con el fin de obtener una muestra representativa de la variabilidad morfológica presente en el experimento.

Apéndice 2.

Determinación de la constante k para el cálculo del área foliar mediante ImageJ

	Área 1	Área 2	Prom área	Largo	Ancho	k
1	61.477	61.196	61.337	15.3	9.8	0.409
2	42.231	41.874	42.053	17.7	6.3	0.377
3	84.439	84.059	84.249	19.5	10.3	0.419
4	33.415	33.131	33.273	15	4.7	0.472
5	80.953	80.566	80.76	17.6	10.5	0.437
6	47.292	46.966	47.129	15.5	6.6	0.461

7	68.253	67.963	68.108	19.4	8.7	0.404
8	68.553	68.161	68.357	20.1	8.6	0.395
9	33.642	33.447	33.545	11.6	6.2	0.466
10	51.597	51.329	51.463	16.9	8.7	0.35
11	92.012	91.565	91.789	25.8	10.4	0.342
12	35.373	35.158	35.266	14.6	6.2	0.39
13	43.008	42.817	42.913	13.2	6.5	0.5
14	26.837	26.619	26.728	10.9	5.4	0.454
						0.42

Nota. Se seleccionaron aleatoriamente 14 hojas de plántulas de copoazú cultivadas en invernadero, incluyendo hojas en diferentes estados de desarrollo. El área foliar de cada hoja se determinó mediante el software **ImageJ** a partir de imágenes digitales calibradas con una escala de referencia. Para ello, se registraron las dimensiones de largo y ancho de cada hoja, mientras que el software calculó el área foliar real considerando su forma y contorno. Posteriormente, a partir de la ecuación empleada para la estimación del área foliar ($\text{Área} = \text{largo} \times \text{ancho} \times k$), se despejó la constante k para cada hoja individual. Finalmente, se calculó el valor promedio de k (0,420), el cual fue utilizado como constante de corrección en las estimaciones de área foliar realizadas durante la evaluación de las variables morfológicas del estudio.

Apéndice 3.

Datos utilizados para la construcción de la curva de calibración de azúcares totales empleando glucosa como estándar de referencia

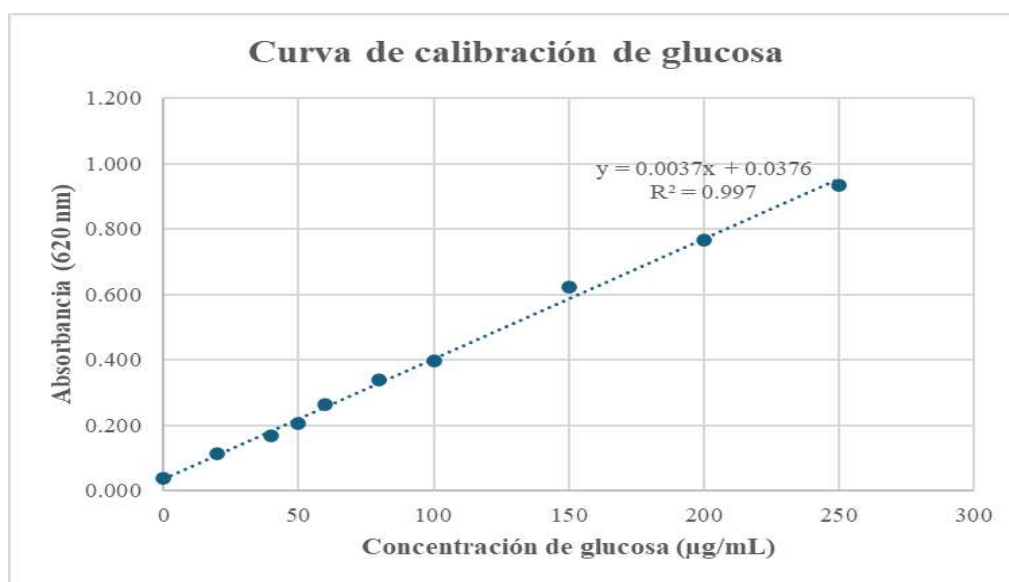
Concentración de glucosa ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia (620 nm)
0	0.037
20	0.113
40	0.169
50	0.206
60	0.265
80	0.339
100	0.398
150	0.624

200	0.768
250	0.934

Nota. Se prepararon soluciones patrón de glucosa con concentraciones entre 0 y 250 $\mu\text{g/mL}$. La determinación se realizó mediante el método colorimétrico de antrona, registrando la absorbancia de cada estándar a 620 nm.

Apéndice 4.

Curva de calibración de glucosa utilizada para la determinación de azúcares totales en tejidos vegetales de copoazú



Nota. Curva de calibración construida a partir de soluciones patrón de glucosa. La relación entre la concentración de glucosa y la absorbancia presentó un comportamiento lineal dentro del rango evaluado, descrito por la ecuación $y = 0.0037x + 0.0376$, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,997. Esta ecuación se utilizó para la cuantificación de azúcares totales en hojas y raíces de copoazú (*Theobroma grandiflorum*).

Apéndice 5.

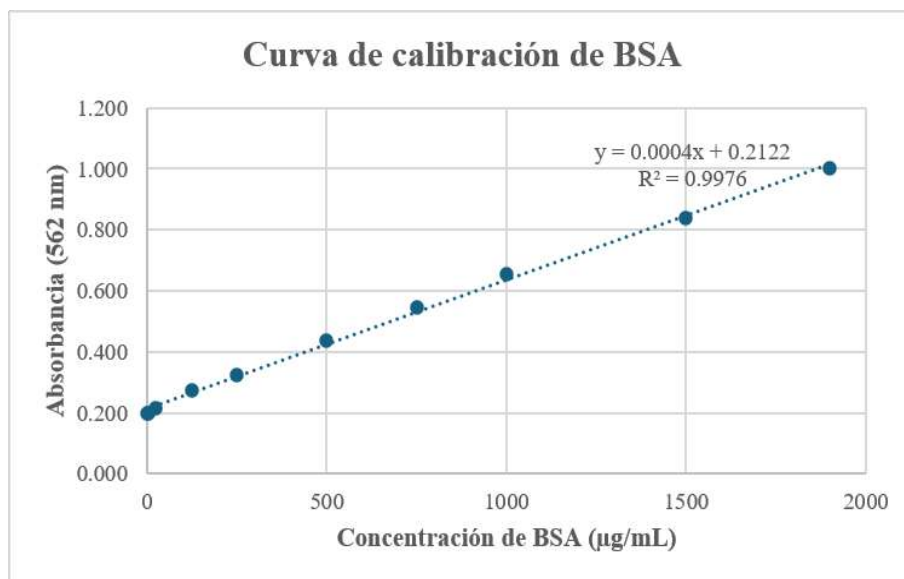
Datos utilizados para la construcción de la curva de calibración de proteínas totales empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de referencia

Concentración de BSA (µg/mL)	Absorbancia (562 nm)
0	0.198
5	0.199
25	0.213
125	0.274
250	0.323
500	0.436
750	0.546
1000	0.656
1500	0.838
1900	1.003

Nota. Se prepararon soluciones patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones entre 5 y 1900 µg/mL. La determinación se realizó mediante el ensayo colorimétrico de ácido bicinonínico (BCA), registrando la absorbancia de cada estándar a 562 nm.

Apéndice 6.

Curva de calibración de BSA utilizada para la determinación de proteínas totales en tejidos vegetales de copoazú



Nota. La relación entre la concentración de BSA y la absorbancia presentó un comportamiento lineal dentro del rango evaluado, descrito por la ecuación $y = 0.0004x + 0.2122$, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9976. Esta ecuación se utilizó para la cuantificación de proteínas en hojas y raíces de copoazú (*Theobroma grandiflorum*).

Apéndice 7.

Datos utilizados para la construcción de la curva de calibración de fenoles empleando ácido gálico como estándar de referencia

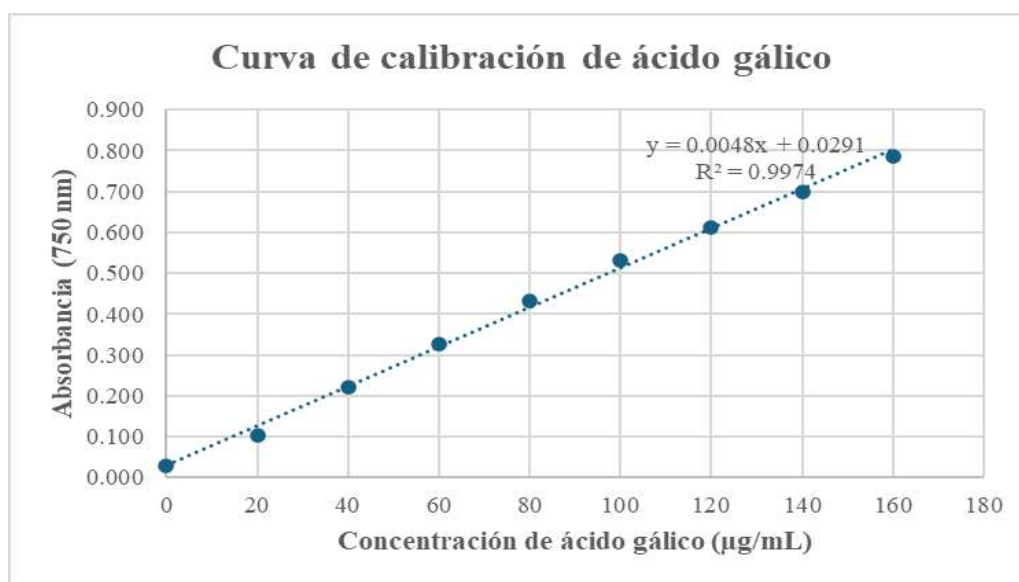
Concentración de ácido gálico (µg/mL)	Absorbancia (750 nm)
0	0.029
20	0.104
40	0.221
60	0.328
80	0.431
100	0.531
120	0.611

140	0.698
160	0.787

Nota. Se prepararon soluciones patrón de ácido gálico en concentraciones entre 0 y 160 µg/mL. La determinación se realizó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, registrando la absorbancia de cada estándar a 750 nm.

Apéndice 8.

Curva de calibración de ácido gálico utilizada para la determinación de fenoles totales en tejidos vegetales de copoazú



Nota. La relación entre la concentración de ácido gálico y la absorbancia presentó un comportamiento lineal dentro del rango evaluado, descrito por la ecuación $y = 0.0048x + 0.0291$, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9974. Esta ecuación se utilizó para la cuantificación de fenoles en hojas y raíces de copoazú (*Theobroma grandiflorum*).

Apéndice 9.

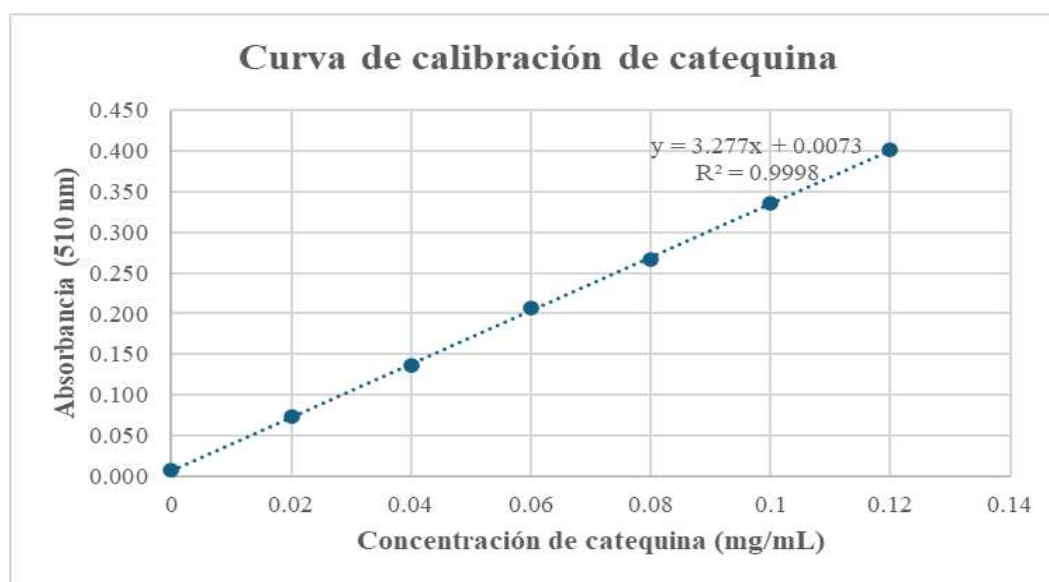
Datos utilizados para la construcción de la curva de calibración de flavonoides empleando catequina como estándar de referencia

Concentración de catequina (mg/mL)	Absorbancia (510 nm)
0	0.007
0.02	0.074
0.04	0.136
0.06	0.207
0.08	0.266
0.1	0.336
0.12	0.401

Nota. Se prepararon soluciones patrón de catequina en concentraciones entre 0 y 0,12 mg/mL. La determinación se realizó mediante el método colorimétrico para flavonoides totales, registrando la absorbancia de cada estándar a 510 nm.

Apéndice 10.

Curva de calibración de catequina utilizada para la determinación de flavonoides totales en tejidos vegetales de copoazú



Nota. La relación entre la concentración de catequina y la absorbancia presentó un comportamiento lineal dentro del rango evaluado, descrito por la ecuación $y = 3.277x + 0.0073$, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9998. Esta ecuación se utilizó para la cuantificación de flavonoides en hojas y raíces de copoazú (*Theobroma grandiflorum*).

Apéndice 11.

Contenido de clorofilas y carotenoides en plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra

	Clorofilas Luz							
	Clorofila a (mg/gPF)	Clorofila b (mg/gPF)	Clorofilas Totales (mg/gPF)	Carotenoides Totales (mg/gPF)	Error Estándar Clorofila a	Error Estándar Clorofila b	Error Estándar Clorofilas Totales	Error Estándar Carotenoi des Totales
Control	1.01	0.39	1.40	0.38	0.15	0.05	0.20	0.05
5 g	2.01	0.75	2.76	0.65	0.16	0.08	0.24	0.05
10 g	1.46	0.52	1.98	0.47	0.11	0.05	0.16	0.03
20 g	1.78	0.67	2.45	0.59	0.35	0.12	0.47	0.12
	Clorofilas Sombra							
	Clorofila a (mg/gPF)	Clorofila b (mg/gPF)	Clorofilas Totales (mg/gPF)	Carotenoides Totales (mg/gPF)	Error Estándar Clorofila a	Error Estándar Clorofila b	Error Estándar Clorofilas Totales	Error Estándar Carotenoides Totales
Control	2.79	0.98	3.77	0.72	0.18	0.04	0.22	0.04
5 g	2.88	1.06	3.95	0.76	0.22	0.07	0.29	0.05
10 g	2.56	0.90	3.46	0.70	0.14	0.05	0.18	0.04
20 g	2.46	0.95	3.41	0.71	0.23	0.09	0.31	0.06

Apéndice 12.

Contenido de carbohidratos totales en plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra

Carbohidratos Luz				
	Hojas (mg/gPF)	Raíces (mg/gPS)	Error Estándar Hojas	Error Estándar Raíz
Control	18.70	23.93	0.86	2.18

5 g	24.59	25.10	0.41	1.23
10 g	16.74	10.44	1.60	1.22
20 g	19.01	16.06	0.78	0.94
Carbohidratos Sombra				
	Hojas (mg/gPF)	Raíces (mg/gPS)	Error Estándar Hojas	Error Estándar Raíz
Control	10.38	17.55	0.36	0.33
5 g	10.66	22.20	0.51	1.45
10 g	12.66	12.50	0.75	0.72
20 g	7.42	16.37	0.60	0.46

Apéndice 13.

Contenido de proteínas totales en hojas y raíces de plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra

Proteínas Luz				
	Hojas (µg/gPF)	Raíces (µg/gPF)	Error Estándar Hojas	Error Estándar Raíz
Control	864.34	880.53	14.61	60.38
5 g	1044.48	387.80	53.63	13.66
10 g	810.60	90.56	22.49	3.48
20 g	559.71	505.13	8.36	20.01
Proteínas Sombra				
	Hojas (µg/gPF)	Raíces (µg/gPF)	Error Estándar Hojas	Error Estándar Raíz
Control	353.21	521.95	5.83	8.44
5 g	443.80	731.26	15.10	41.48
10 g	532.49	24.26	34.92	4.43
20 g	810.63	198.26	16.41	8.01

Apéndice 14.

Contenido de fenoles totales en hojas y raíces de plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra

Fenoles Luz

	Hojas (mg/gPF)	Raíces (mg/gPS)	Error Estándar Hojas	Error Estándar Raíz
Control	14.06	14.98	1.19	0.27
5 g	20.22	10.35	0.48	0.15
10 g	14.13	15.09	0.37	0.38
20 g	18.86	16.02	0.54	0.35
Fenoles Sombra				
	Hojas (mg/gPF)	Raíces (mg/gPS)	Error Estándar Hojas	Error Estándar Raíz
Control	13.12	17.79	0.37	0.53
5 g	11.37	19.17	0.47	0.34
10 g	11.68	21.47	1.05	0.22
20 g	12.29	19.90	0.60	0.40

Apéndice 15.

Contenido de flavonoides totales en hojas y raíces de plántulas de copoazú tratadas con pulpa de café bajo condiciones de luz y sombra

Flavonoides Luz				
	Hojas (mg/gPF)	Raíces (mg/gPS)	Error Estándar Hojas	Error Estándar Raíz
Control	10.96	12.68	0.17	0.30
5 g	16.50	9.18	0.63	0.17
10 g	12.19	14.21	0.09	0.62
20 g	11.20	14.62	1.19	0.51
Flavonoides Sombra				
	Hojas (mg/gPF)	Raíces (mg/gPS)	Error Estándar Hojas	Error Estándar Raíz
Control	12.85	15.12	0.15	0.49
5 g	11.62	14.06	0.10	0.50
10 g	12.05	13.38	0.13	0.67
20 g	12.45	18.91	0.17	0.21

Apéndice 16.

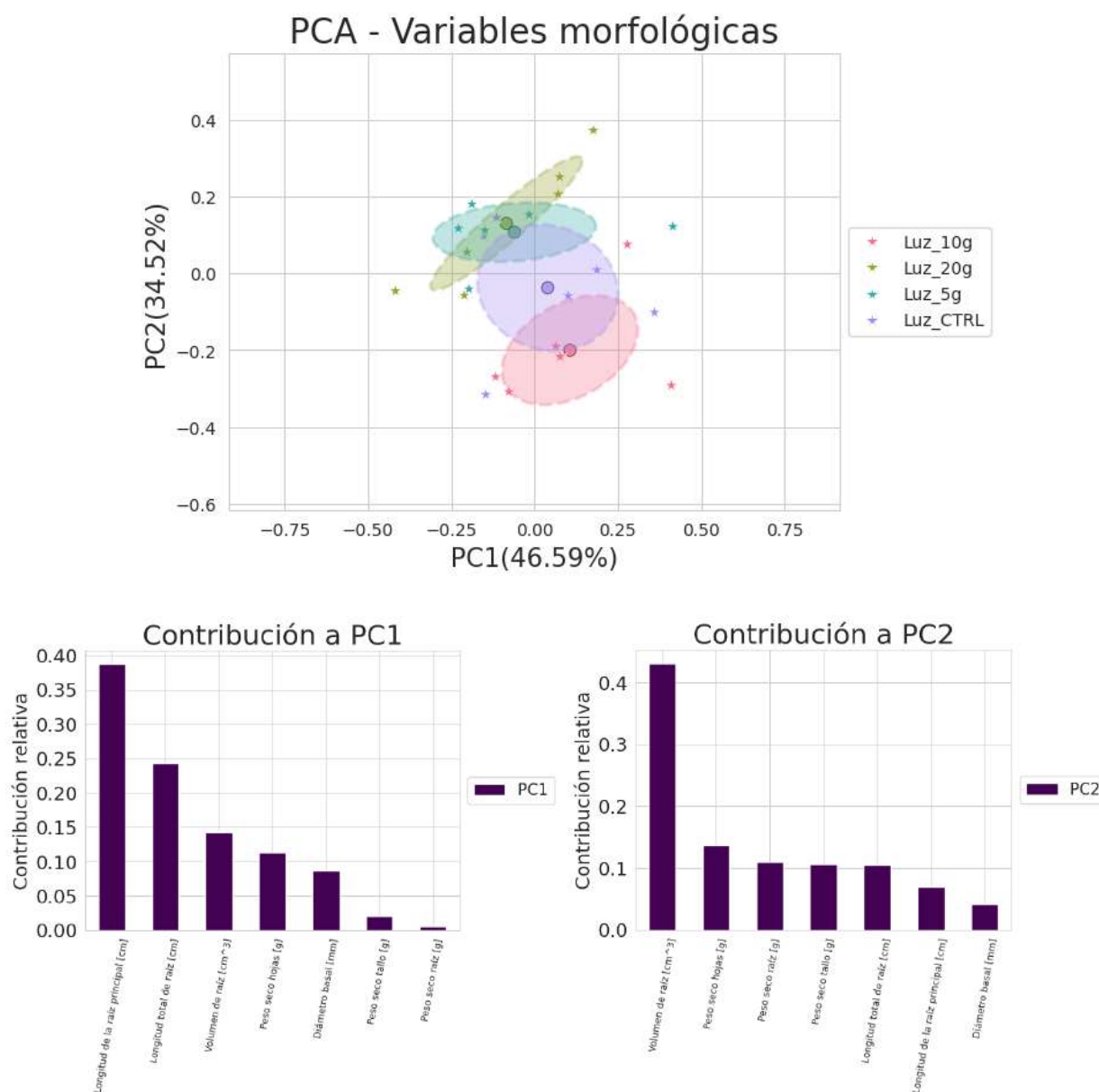
Propiedades fisicoquímicas del sustrato al final del ciclo experimental bajo diferentes dosis de pulpa de café

	LUZ SOLAR DIRECTA				SOMBRA (65%)			
	Control	5 g	10 g	20 g	Control	5 g	10 g	20 g
pH	5.6	6.9	7.8	7.6	5.6	6.7	7	7.8
C (%)	4.41	3.98	4.06	3.81	2.98	4.09	5.04	4.17
P (ppm)	203.7	175.08	176.67	170.02	189.1	201.82	174.36	194.59
Ca (meq/100g)	6.14	6.63	6.2	6.79	6.23	6.53	7.02	6.7
Mg (meq/100g)	1.73	2.12	2.19	2.52	1.76	2.1	2.4	2.66
Na (meq/100g)	0.3	0.4	0.35	0.31	0.26	0.28	0.33	0.46
K (meq/100g)	1.08	4.03	4.64	4.63	1.09	3.75	4.6	4.67
Arena (%)	78	88	86	90	76	86	84	88
Limo (%)	20	10	12	8	22	12	16	12
Arcilla (%)	2	2	2	2	2	2	0	0
Textura	Arenoso-franco	Arenoso	Arenoso	Arenoso	Arenoso-franco	Arenoso	Arenoso-franco	Arenoso
B (ppm)	0.32	1.09	1.86	2.66	0.32	0.31	0.39	3.75
Fe (ppm)	44.56	37.76	33.2	28.64	50.64	27.84	26.12	14.12
Mn (ppm)	5.85	8.13	11.48	16.23	7.37	8.44	10.95	19.98
Cu (ppm)	0.65	1.08	1.2	1.68	0.59	0.88	1.03	1.63
Zn (ppm)	4.39	4.81	5.23	5.11	4.75	4.63	4.72	5.46
CIC (meq/100g)	17.6	20.4	29.2	29.2	24.4	24.2	29.2	31.2
N total (%)	0.43	0.47	0.59	0.77	0.36	0.49	0.58	0.99
Materia Orgánica (%)	7.6	6.86	7	6.57	5.14	7.05	8.69	7.19
Relación C/N	10.18	8.49	6.86	4.95	8.39	8.4	8.66	4.23
Relación Ca/Mg	3.55	3.13	2.83	2.69	3.54	3.11	2.93	2.52
Relación Ca/K	5.69	1.65	1.34	1.47	5.72	1.74	1.53	1.43
Relación Mg/K	1.6	0.53	0.47	0.54	1.61	0.56	0.52	0.57
Relación Ca+Mg/K	7.29	2.17	1.81	2.01	7.33	2.3	2.05	2

Nota. Se presentan los valores absolutos de las propiedades químicas y físicas del suelo determinados al finalizar el experimento para las condiciones de alta irradiancia y sombra. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio Químico de consultas industriales (LQCI).

Apéndice 17.

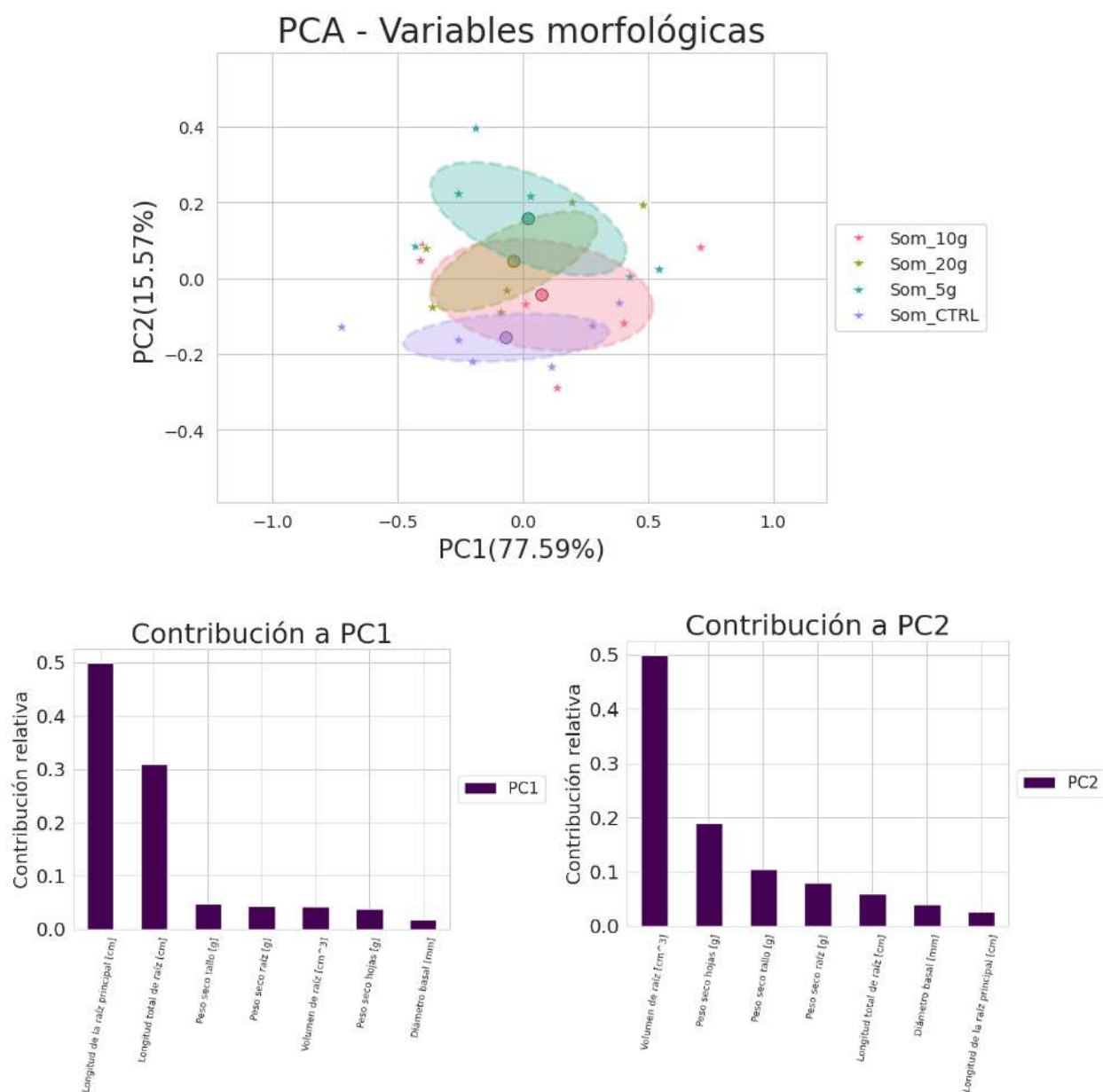
Análisis de componentes principales (PCA) de las variables morfológicas evaluadas bajo condición de luz solar directa



Nota. El análisis de componentes principales (PCA) muestra una diferenciación parcial entre los tratamientos evaluados bajo condición de luz, explicando el 81,11 % de la variación total mediante los dos primeros componentes.

Apéndice 18.

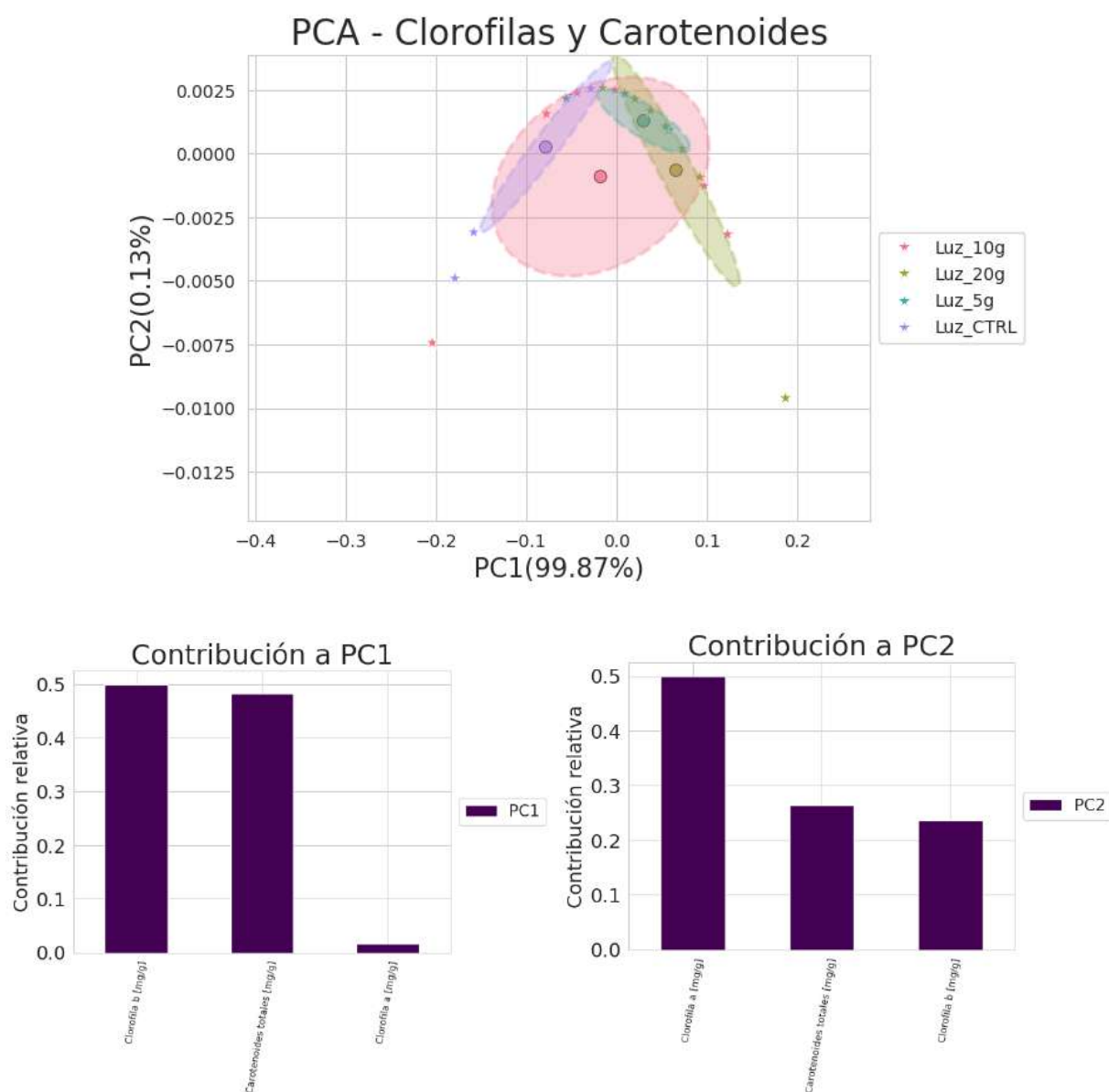
Análisis de componentes principales (PCA) de las variables morfológicas evaluadas bajo condición de sombra al 65%



Nota. El análisis de componentes principales (PCA) de las variables morfológicas bajo condición de sombra explicó el 93,16 % de la variación total mediante los dos primeros componentes.

Apéndice 19.

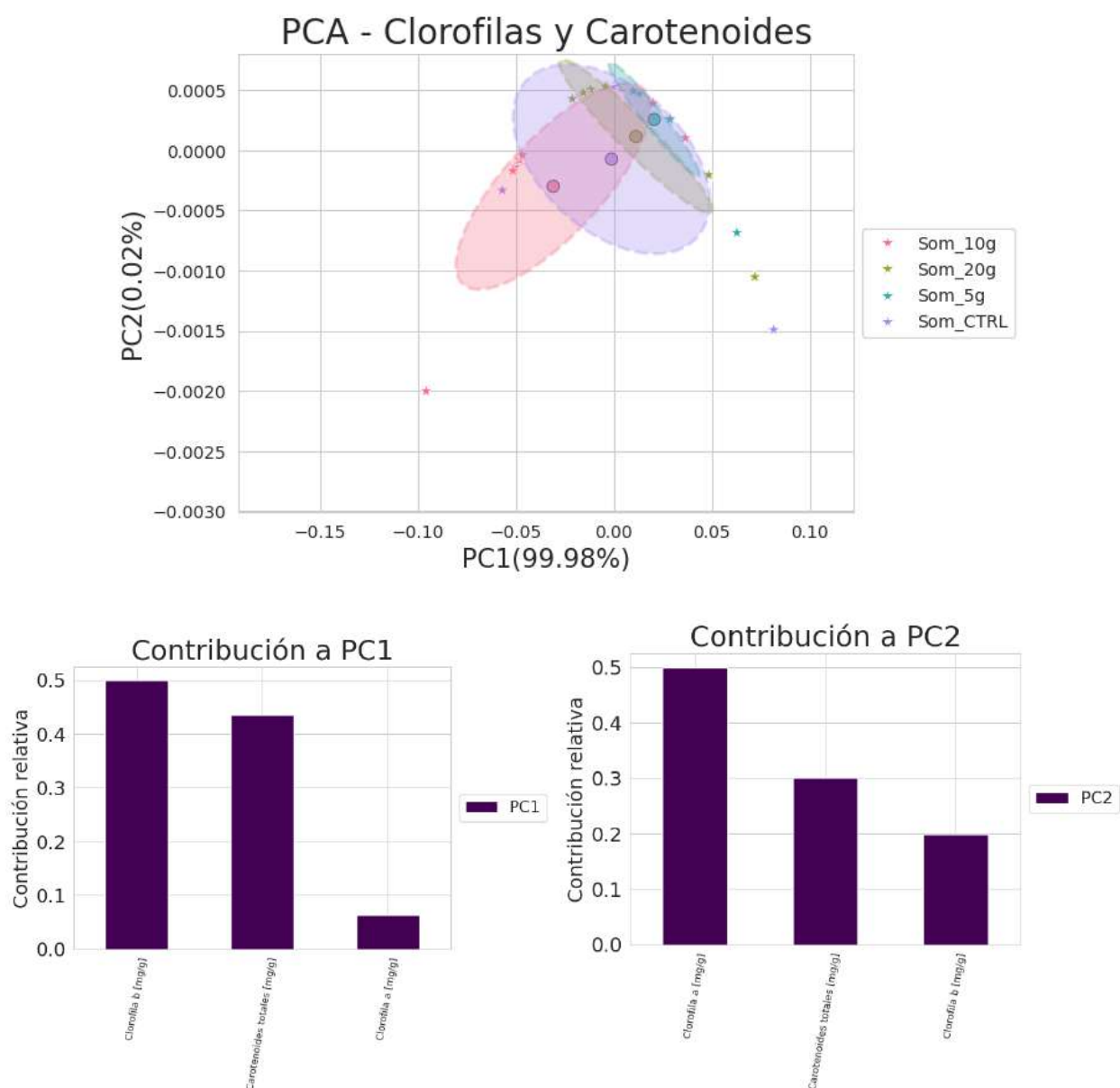
Análisis de componentes principales (PCA) del contenido de Clorofilas y Carotenoides evaluadas bajo condición de luz solar directa



Nota. El análisis de componentes principales (PCA) muestra la distribución multivariada de los tratamientos evaluados únicamente bajo condición de luz, considerando el contenido de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales. Los dos primeros componentes explicaron el 100 % de la variación total.

Apéndice 20.

Análisis de componentes principales (PCA) del contenido de Clorofilas y Carotenoides evaluadas bajo condición de sombra al 65%



Nota. El análisis de componentes principales (PCA) muestra la distribución multivariada de los tratamientos evaluados bajo condición de sombra, considerando el contenido de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales. Los dos primeros componentes explicaron el 100 % de la variación total.

Apéndice 21.

Tablas ANOVA con significancia de variables morfológicas y de biomasa

Longitud raíz principal - Luz						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	10.9749823	4.17090006	0.03366068	0.37337068

Diámetro basal - Luz						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	11.0051757	4.75795792	0.02307372	0.46033165

Peso seco raíz - Luz				
	Source	ddof1	H	p_unc
Kruskal	Group	3	11.4533333	0.0095109

Volumen de raíz - Luz						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	10.8401482	20.158549	9.63E-05	0.64475015

Peso seco raíz - Sombra						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	10.8834911	5.70698094	0.01343401	0.51189018

Diámetro basal - Sombra						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	10.6339852	7.66072374	0.00523612	0.42369903

Peso seco tallo - Sombra						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	10.6645881	5.24917416	0.0179438	0.38881049

Volumen de raíz - Sombra				
	Source	ddof1	H	p_unc
Kruskal	Group	3	13.6476935	0.00342612

Nota. Se presentan los resultados de las pruebas de significancia para las variables morfológicas y de biomasa. Previamente se verificaron los supuestos de normalidad (Shapiro–Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene). Cuando los supuestos se cumplieron, se aplicó un ANOVA de Welch; en caso contrario, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis. Se reportan los estadísticos de prueba (F o H), los grados de libertad (ddof), el valor de significancia (p), y el tamaño del efecto (n^2 parcial, np^2) cuando fue aplicable.

Apéndice 22.

Tablas ANOVA con significancia de clorofilas y carotenoides

Clorofila a - Luz						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	11.042834	13.8553342	0.00046277	0.64282606

Clorofila b - Luz						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	10.9901421	11.2434055	0.00112315	0.62630789

Clorofila total - Luz						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	11.0513389	12.9936351	0.00060603	0.64039986

Carotenoides - Luz						
	Source	ddof1	ddof2	F	p_unc	np2
0	Group	3	11.020782	11.6605219	0.00095955	0.59009154

Nota. Se presentan los resultados de las pruebas de significancia para las concentraciones de clorofilas y carotenoides. Tras verificar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se aplicó ANOVA de Welch o la prueba de Kruskal–Wallis, según correspondiera. Se incluyen los estadísticos de prueba (F o H), los grados de libertad (ddof), el valor de significancia (p) y el tamaño del efecto (n^2 parcial, np^2).

Apéndice 23.*Tablas ANOVA con significancia de Carbohidratos totales*

	Carbohidratos totales - Luz					ART ANOVA	
	Term	Df	Df.res	Sum Sq	Sum Sq.res	F value	Pr(>F)
Group	Group	3	40	3158.166667	6034.916667	6.977542726	0.000694634
Location	Location	1	40	126.75	9064	0.559355693	0.458894702
Group:Location	Group:Location	3	40	884.5	8142.666667	1.448337973	0.243134356

	Carbohidratos totales - Sombra							Mixed-ANOVA	
	Source	SS	DF1	DF2	MS	F	p_unc	np2	eps
0	Group	144.3811854	3	20	48.1270618	1.44009789	0.260839728	0.177641509	
1	Location	566.5888824	1	20	566.5888824	11.22138464	0.003189413	0.35941342	1
2	Interaction	226.79766	3	20	75.59921999	1.497254803	0.245753547	0.183398972	

Nota. Se presentan los resultados del análisis para el contenido de carbohidratos totales. Dependiendo del cumplimiento de los supuestos y de la estructura de los datos, se empleó un ANOVA de Rangos Alineados (ART ANOVA) o un ANOVA mixto para evaluar los efectos del tratamiento, la localización (órgano vegetal) y su interacción. En las tablas, Group corresponde al efecto del tratamiento, Location al efecto del órgano vegetativo (hojas y raíces) e Interaction al efecto conjunto entre ambos factores. Se reportan las sumas de cuadrados (SS), los grados de libertad (DF), los cuadrados medios (MS), el estadístico F, el valor de significancia (p) y el tamaño del efecto (η^2 parcial; ηp^2), cuando fue aplicable.

Apéndice 24.*Tablas ANOVA con significancia de Proteínas totales*

	Proteinas totales - Luz					ART ANOVA	
	Term	Df	Df.res	Sum Sq	Sum Sq.res	F value	Pr(>F)
Group	Group	3	40	1741.166667	7369	3.150435006	0.035309883
Location	Location	1	40	1680.333333	7479	8.986941213	0.00465715
Group:Location	Group:Location	3	40	2052.166667	7105	3.851122058	0.016387006

	Proteínas totales - Sombra					ART ANOVA	
	Term	Df	Df.res	Sum Sq	Sum Sq.res	F value	Pr(>F)
Group	Group	3	40	2862.166667	6198	6.157183321	0.001527474
Location	Location	1	40	816.75	8002.333333	4.082559254	0.050058473
Group:Location	Group:Location	3	40	5252.916667	3712.666667	18.86484707	8.79379E-08

Nota. Se presentan los resultados del análisis para el contenido de proteínas totales mediante ANOVA de Rangos Alineados (ART ANOVA), considerando los efectos del tratamiento, la localización (órgano vegetal) y su interacción. En las tablas, Group representa el efecto del tratamiento, Location el efecto del órgano vegetativo (hojas y raíces) e Interaction la interacción entre ambos factores. Se reportan las sumas de cuadrados (SS), los grados de libertad (DF), los cuadrados medios (MS), el estadístico F y el valor de significancia (p).

Apéndice 25.

Tablas ANOVA con significancia de Flavonoides

	Flavonoides totales - Luz							Mixed-ANOVA	
	Source	SS	DF1	DF2	MS	F	p_unc	np2	eps
0	Group	13.0670854	3	20	4.355695134	0.38093858	0.767801439	0.054052202	
1	Location	0.016928264	1	20	0.016928264	0.001016435	0.974882512	5.08E-05	1
2	Interaction	217.1055512	3	20	72.36851707	4.345270849	0.016385666	0.394596395	

	Flavonoides totales - Sombra							Mixed-ANOVA	
	Source	SS	DF1	DF2	MS	F	p_unc	np2	eps
0	Group	67.88281498	3	20	22.62760499	1.38981976	0.274895996	0.172509415	
1	Location	117.2317285	1	20	117.2317285	7.132102845	0.014692	0.262865834	1
2	Interaction	46.59183513	3	20	15.53061171	0.944845917	0.437678792	0.124133792	

Apéndice 26.

Tablas ANOVA con significancia de Fenoles

	Fenoles totales - Luz							Mixed-ANOVA	
	Source	SS	DF1	DF2	MS	F	p_unc	np2	eps
0	Group	66.81885055	3	20	22.27295018	1.19008332	0.338779953	0.151472724	

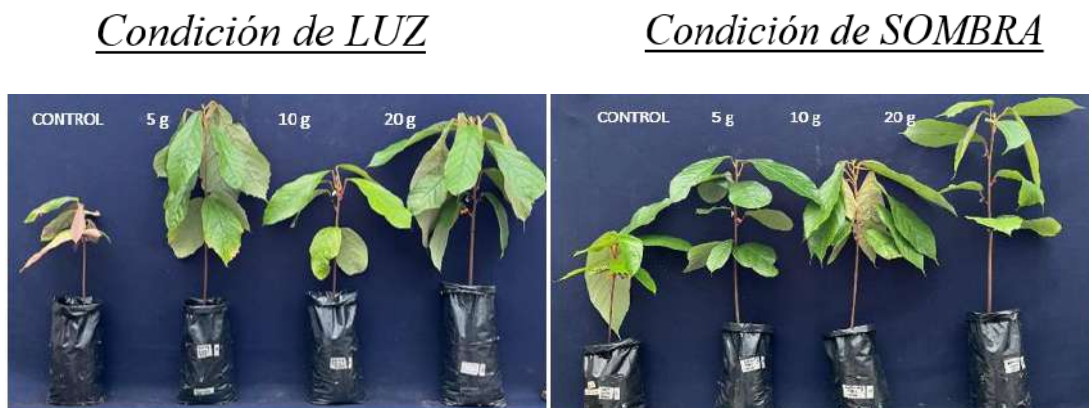
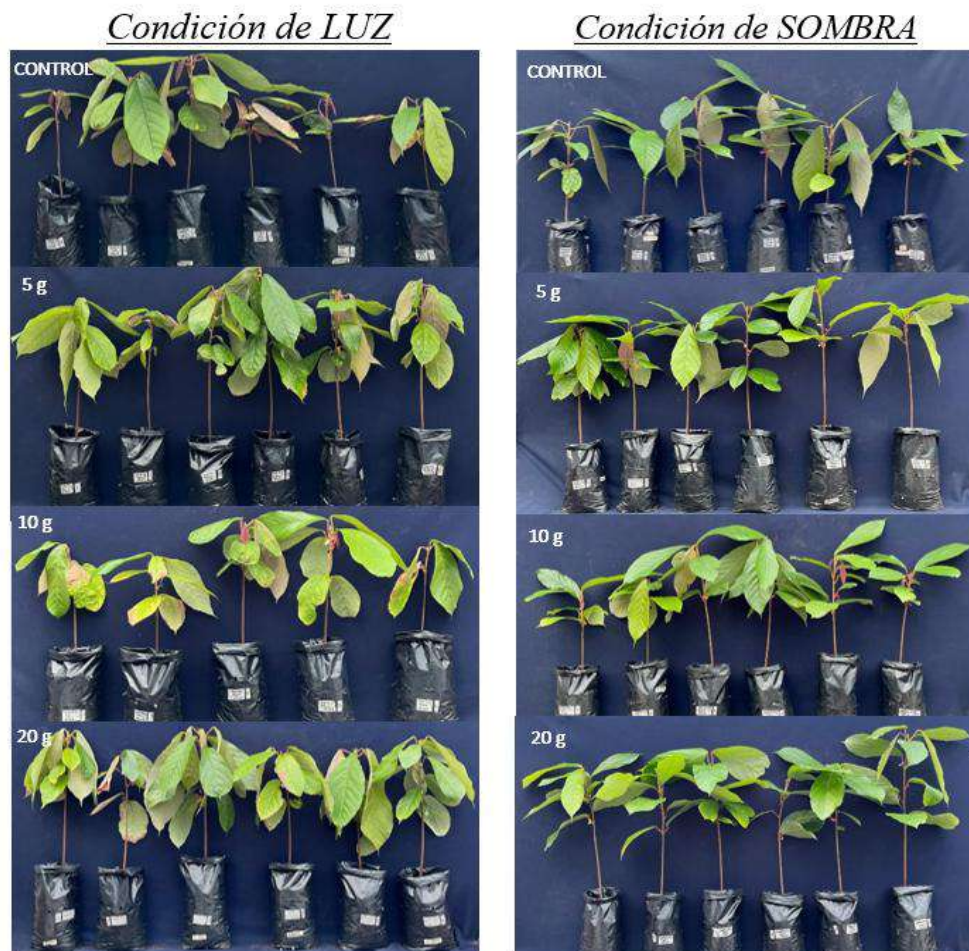
1	Location	87.83657158	1	20	87.83657158	4.324617472	0.050641195	0.177787687	1
2	Interaction	233.5181331	3	20	77.83937769	3.832407466	0.025589009	0.365023374	

	Fenoles totales - Sombra							Mixed-ANOVA	
	Source	SS	DF1	DF2	MS	F	p_unc	np2	eps
0	Group	12.90083452	3	20	4.300278173	0.353803109	0.786877818	0.050395931	
1	Location	669.0453351	1	20	669.0453351	25.26010092	6.48E-05	0.558109691	1
2	Interaction	40.10667811	3	20	13.3688927	0.504748425	0.683381242	0.070383379	

Nota. Se presentan los resultados del ANOVA mixto para el contenido de los metabolitos evaluados, considerando los efectos del tratamiento, la localización (órgano vegetal) y su interacción. En las tablas, Group indica el efecto del tratamiento, Location el efecto del órgano vegetativo (hojas y raíces) e Interaction el efecto de la interacción entre ambos factores. Se reportan las sumas de cuadrados (SS), los grados de libertad (DF), los cuadrados medios (MS), el estadístico F, el valor de significancia (p), el tamaño del efecto (η^2 parcial; ηp^2) y la corrección de esfericidad (ϵ).

Apéndice 27.

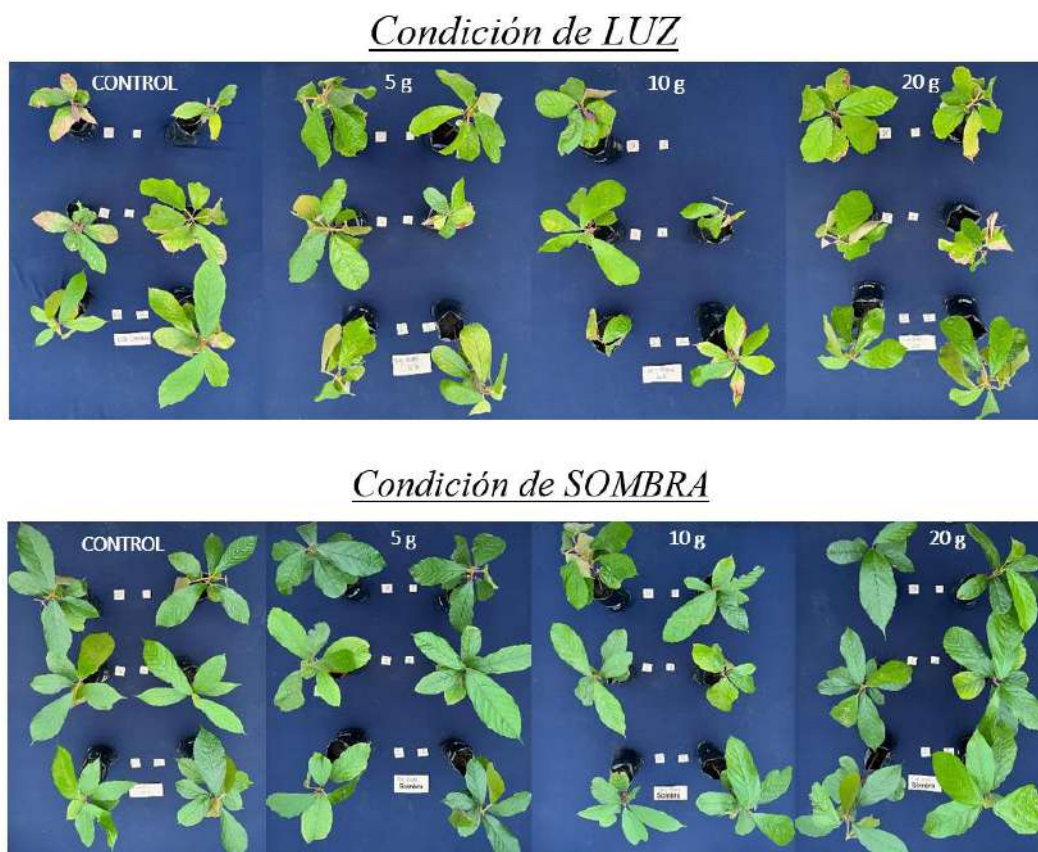
*Registro fotográfico en vista frontal de las plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) previo a la cosecha destructiva, bajo condiciones de luz y sombra*



Nota. Las imágenes muestran las plántulas correspondientes a los tratamientos Control, 5 g, 10 g y 20 g de pulpa de café, organizadas según la condición lumínica (luz y sombra), antes de la recolección de material vegetal para los análisis morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

Apéndice 28.

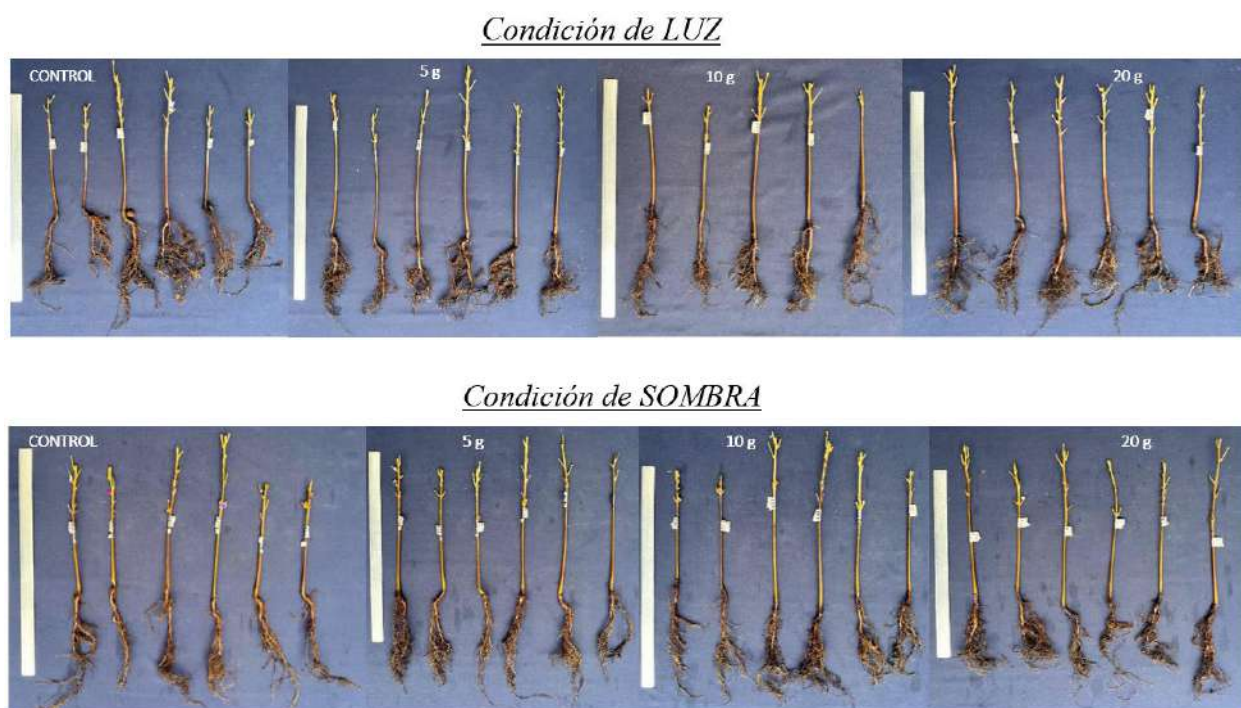
Registro fotográfico en vista superior de las plántulas de copoazú (Theobroma grandiflorum) previo a la cosecha destructiva, bajo condiciones de luz y sombra



Nota. Las fotografías permiten apreciar la disposición y el desarrollo del área foliar de las plántulas pertenecientes a los tratamientos Control, 5 g, 10 g y 20 g de pulpa de café, antes de la cosecha destructiva y la realización de los análisis experimentales.

Apéndice 29.

*Registro fotográfico de las plántulas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) después de la cosecha destructiva y el lavado del sistema radical, bajo condiciones de luz y sombra*



Nota. Las imágenes muestran las plántulas de los tratamientos Control, 5 g, 10 g y 20 g de pulpa de café, organizadas según la condición lumínica (luz y sombra), después de la cosecha destructiva y del lavado cuidadoso de las raíces para retirar el sustrato adherido. Este registro permitió documentar y comparar visualmente la arquitectura, la longitud y el volumen del sistema radical entre los diferentes tratamientos.