



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIETADES ARÁBICA (*Coffea arábica*) Y
ROBUSTA (*Coffea canephora*) EN CAFÉ NACIONAL EMPLEANDO LA
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

MURCIA VARGAS ELIZABETH

ASESORES: DR. JOSE FRANCISCO MONTIEL SOSA

MC. JOSEFINA MORENO LARA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto de los ojos, y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces.

Aristóteles

DEDICATORIA

A mis padres Alberto Murcia Ureña y Georgina Vargas Yañez sabiendo que no existirá una forma de agradecerles toda una vida de sacrificios y esfuerzos, quiero que sientan el objetivo aquí logrado también como suyo pues la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo.

A mis hermanos Carlos Alberto y Edwin Murcia Vargas por ser el pilar cuando estuve a punto de fracasar. Por estar cerca de mí, compartiendo las experiencias más importantes de mi vida y mi carrera, porque gracias a ustedes he llegado a realizar una de mis mejores metas.

A mis profesores Dr. J. Francisco Montiel Sosa por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, del cual me llevo grandes enseñanzas, a la M.C Josefina Moreno Lara, quien trabajó a la par conmigo, brindándome su amistad, parte de sus conocimientos y experiencia para el desarrollo y conclusión del presente proyecto a la Q.F.B. Angélica Saldaña Martínez por la resolución de dudas en algunos casos así como por la confianza depositada.

A ustedes amigos (Eva, Raúl "Ruly", Marlene "Chinos", Jhayra "Flacuchis", Jeanette, a todo el clan de la I.A 28) porque supieron, consolar tristezas, compartir sueños, saborear logros... porque nunca estuve sola. Gracias por su compañía, por saberme escuchar, les agradezco la ayuda cuando la confianza me llegaba a faltar, al igual de tener palabras de aliento cuando las necesité.

A aquellos que aún estando tan lejos nunca dejaron de darme ánimos, teniendo confianza en que lo lograría y tenían razón, agradezco también al proyecto PAPIT con número de clave IN213712 y al proyecto PAPIME (PE203211/PE201412), por el apoyo recibido para la realización y conclusión de éste proyecto.

A TODOS "GRACIAS"

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
PRESENTACIÓN DEL TRABAJO	vi
RESUMEN	vii
TERMINOLOGÍA	viii
INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1. El café	3
1.1 Historia y Generalidades del café.....	3
1.2 Clasificación botánica del café.....	4
1.3 Especies existentes y características.....	4
1.4 Composición química.....	6
1.5 Cultivo del café.....	10
1.6 Tecnología y procesado del café.....	11
1.7 Situación actual del café.....	19
1.7.1 Producción, Exportación, Importación y Consumo Nacional de café.....	20
1.7.2 Producción, Exportación, Importación y Consumo Mundial de café.....	21
Capítulo 2. Aplicaciones biotecnológicas en la autenticación de alimentos. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
2.1 Métodos utilizados para la autenticación de alimentos.....	23
2.1.1 Análisis de Proteínas.....	23
2.1.2 Análisis de DNA. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	26
2.1.2.1 Fundamento de la PCR.....	26
2.1.2.2 Etapas de la reacción.....	27
2.1.2.3 Componentes de la Reacción.....	28
2.1.3 Análisis del producto obtenido de la PCR.....	29
2.1.4 Técnica del RFLP.....	30

Capítulo 3. Los cloroplastos.....	31
3.1 DNA de Cloroplasto (cpADN).....	32
3.2 Organización del genoma de cloroplasto (cpADN) del café Arábica (<i>Coffea arábica</i>).....	33
Capítulo 4. Metodología experimental.....	35
4.1 Cuadro metodológico.....	35
4.1.1 Descripción del cuadro metodológico.....	36
4.1.1.1 Actividades preliminares.....	36
4.1.1.2 Objetivos particulares.....	36
4.2 Materiales.....	37
4.2.1 Material biológico.....	37
4.2.2 Reactivos, Materiales y Equipo utilizado.....	39
4.3 Métodos.....	40
4.3.1 Extracción de DNA total a partir de tejido vegetal.....	40
4.3.1.1 Método siguiendo la técnica de Sambrook, 2001.....	41
4.3.1.2 Método siguiendo la técnica del kit ZR Plant/Seed.....	46
4.3.1.3 Método siguiendo el kit Phire Plant Direct PCR.....	48
4.3.2 Cuantificación de DNA por medición de Absorbancia.....	42
4.3.3 Amplificación de DNA por PCR.....	42
4.3.3.1 Preparación de la reacción.....	43
4.3.3.2 Programa de PCR.....	43
4.3.4 Análisis de los productos.....	44
4.3.4.1 Preparación del gel de agarosa y Electroforesis horizontal.....	44
4.3.5 Diseño de RFLP.....	47
Capítulo 5. Resultados y discusión.....	49
CONCLUSIONES.....	63
REFERENCIAS.....	65
ANEXO.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Franja del trópico de Cáncer y de Capricornio.

Figura 2. Proceso en beneficio húmedo del café.

Figura 3. Proceso en beneficio seco del café.

Figura 4. Países productores de café.

Figura 5. Exportación, Producción y Consumo de café a nivel mundial.

Figura 6. Ciclos de la PCR.

Figura 7. Estructura del cloroplasto.

Figura 8. Vista tridimensional del cloroplasto.

Figura 9. Mapa del genoma circular del café arábica (*Coffea arábica*).

Figura 10. Cuadro metodológico.

Figura 11. Etapas y condiciones programadas en el termociclador para Arábica (*Coffea arábica*) y Robusta (*Coffea canephora*).

Figura 12. Genoma completo de Cloroplasto del café Arábica (*Coffea Arábica*).

Figura 13. Fotografía de un gel de agarosa al 3% que expone muestras filogenéticamente parecidas (1 a 7) y lejanas en el caso de la leche (8).

Figura 14. Fotografía de un gel de agarosa al 3% que muestra los amplificadores resultantes de la PCR en grano verde de café de la variedad Arábica y Robusta.

Figura 15. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los fragmentos resultantes del RFLP después de la digestión con la enzima *Pvu I*, en grano verde de café de la variedad Arábica y Robusta.

Figura 16. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los amplificadores resultantes de la PCR en granos verdes de café.

Figura 17. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los fragmentos resultantes del RFLP después de la digestión con la enzima *Pvu I*, en grano verde de café de las variedades Arábica y Robusta.

Figura 18. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los amplificadores resultantes de la PCR en café tostado y procesado.

Figura 19. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los amplificadores resultantes de la PCR en café en grano tostado.

Figura 20. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los fragmentos resultantes del RFLP en café en grano tostado.

Figura 21. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los amplificadores resultantes de la PCR en café en grano tostado.

Figura 22. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los fragmentos resultantes del RFLP en café en grano tostado.

Figura 23. Presentación del artículo publicado por Spaniolas, 2006.

Figura 24. Muestra de la ubicación del genoma del cloroplasto de la especie de café Arábica en NCBI.

Figura 25. Muestra del programa bioinformático blast 2 sequences en la web.

Figura 26. Muestra del ingreso de los primers al programa bioinformático blast 2 sequences.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica del café.

Tabla 2. Composición química de la especie Arábica y Robusta en grano verde.

Tabla 3. Composición química del café en grano tostado.

Tabla 4. Calidad del café en México.

Tabla 5. Destino de las exportaciones mexicanas.

Tabla 6. Criterios de selección del primer.

Tabla 7. Función de los genes de acuerdo al color en la figura 11.

Tabla 8. Muestras de café verde utilizadas para la experimentación

Tabla 9. Muestras de café en grano tostado y procesado utilizado para la experimentación

Tabla 10. Algunos de los resultados obtenidos con la técnica de Sambrook, 2001.

Tabla 11. Componentes de la reacción según Promega en el kit de PCR.

Tabla 12. Muestra biológica y reactivos necesarios para la carga del gel de agarosa.

Tabla 13. Componentes para la reacción de PCR directa, según kit Phire Plant Direct PCR, de la empresa Finnzymes.

Tabla 14. Resultados de la extracción de DNA con distintas metodologías.

Tabla 15. Valores de concentración y absorbancia relación (260/280) de las muestras Arábica y Robusta.

Tabla 16. Resultados obtenidos de la extracción de DNA en el café ya procesado (molido) de distintas marcas comerciales con el kit ZR Plant/Seed de Zymo Research de la empresa Fermentas.

Tabla 17. Resultados obtenidos de la extracción de DNA en el café en grano tostado de distintas marcas comerciales con el kit ZR Plant/Seed de Zymo Research de la empresa Fermentas.

Tabla 18. Proteínas codificadas en el genoma de cloroplasto.

Presentación del trabajo

La presente tesis es una propuesta metodológica que consiste en la identificación de las variedades Arábica (*Coffea arábica*) y Robusta (*Coffea canephora*) en café nacional empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa y consta de dos partes fundamentales; la primera corresponde a la parte teórica, la cual es el sustento del proyecto realizado, así como de los resultados obtenidos y la segunda corresponde a la parte metodológica en la que se describe paso a paso de manera detallada la experimentación.

La sección teórica abarca tres capítulos. En el primero se habla del café en términos de su historia - generalidades; variedades existentes - características; cultivo; producción a nivel mundial - nacional; tecnología - procesado; y de la situación actual. En el segundo capítulo se hace referencia a algunas técnicas utilizadas en la autenticación de alimentos, mencionando el fundamento y la importancia de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en comparación con otros análisis. En el tercer capítulo se habla del cloroplasto, tomando en cuenta su estructura e importancia para este estudio.

Posteriormente el cuarto capítulo incluye la metodología experimental, describiendo las condiciones de trabajo, el equipo utilizado, así como los reactivos y el análisis de los productos obtenidos.

Resumen

El presente trabajo muestra los resultados de la experimentación realizada, la cual tiene su fundamento en un método recientemente utilizado en la autenticación de alimentos, conocido como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o *Polymerase Chain Reaction* (PCR) por sus siglas en inglés. Esta técnica ha sido aprobada para desenmascarar posibles adulteraciones con diversas especies extrañas o de menor valor económico, pues la sustitución de una especie por otra, durante la fabricación de cualquier tipo de producto, supone un fraude para el consumidor así como para las empresas distribuidoras respondiendo al interés del sector alimentario de verificar la calidad y pureza de los productos que comercializa, además de cumplir con las normas correspondientes, se hace necesario un planteamiento metodológico, el cual nos permita cumplir los objetivos aquí planteados. [28,37]

Este proyecto implicó la revisión bibliográfica de artículos relacionados con el café, hablando de generalidades como; características, composición, procesamiento, etc. Y de manera más particular información que incluye; métodos de extracción de DNA, la modificación de una técnica ya utilizada (PCR), así como el diseño de un (RFLP), Restriction Fragment Length polymorphism por sus siglas en inglés, para lograr la identificación de las variedades Arábica (*Coffea arábica*) y Robusta (*Coffea canephora*) en café nacional, ya que la segunda tiene un menor valor económico y pudiera ser utilizada con la finalidad de adulterar de manera accidental o deliberada la materia prima.

Terminología

Adulteración:	Alteración de la calidad o pureza por la adición de una sustancia extraña.
Amplificación:	Generación de un gran número de copias de un fragmento específico de DNA.
Annealing:	“Apareamiento”, los cebadores “primer” reaccionan con la hebra sencilla de DNA y se pegan en lugares específicos por complementariedad de bases.
Autenticar:	Acreditar, certificar o dar fe con autoridad legal.
BrEt:	“Bromuro de Etidio”, agente intercalante de DNA. Emite fluorescencia cuando se irradia con luz ultravioleta.
DNA diana:	Es el fragmento de DNA que se desea amplificar, también se le llama DNA molde.
Elongación:	“Extensión”, La enzima Taq Polimerasa extiende los “primers”, y coloca dinucleótidos trifosfatados (dNTP’s).
Mapa de restricción:	De una molécula de DNA dada se obtendrán siempre los mismos fragmentos cada vez que sea expuesta a una enzima de restricción particular.
Nt:	Base (timina, guanina, citosina o adenina), ligada a un azúcar y un grupo fosfato.
PCR:	Técnica de la biología molecular para amplificar un fragmento de DNA, generando miles de millones de copias de una secuencia particular.
Primer:	Cadena complementaria a la cadena de DNA molde, utilizada por la Taq polimerasa para seguir la síntesis de nucleótidos.
RFLP:	Técnica utilizada para identificar diferencias en los nucleótidos de un fragmento específico de DNA amplificado con ayuda de enzimas de restricción.
Sitio de restricción:	Es la secuencia de DNA reconocida por una enzima.
Tm:	Temperatura de alineamiento o hibridación.

Introducción

El café es uno de los productos más importantes del mundo, representa una fuente de ingresos para millones de personas en los países productores; Brasil, Etiopía, Vietnam, Perú, Indonesia, Colombia, Honduras, Uganda, Guatemala, Costa Rica, India y México. [8] Su comercio está compuesto exclusivamente por dos variedades, Arábica (*Coffea arábica*) y Robusta (*Coffea canephora*), el primero contribuye con alrededor del 70% del total de la producción mundial, la cual se enfoca a países como Estados Unidos, España, Alemania, Francia, Reino Unido, Japón, Italia, entre otros. [39,44] Se le considera de alta calidad, teniendo de 2-3 veces el precio del Robusta, [44,55] por lo que su autenticidad es importante para productores y consumidores, debido a la probable adulteración en grano verde, con la incorporación de la cáscara o granos de Robusta. [42] La mayoría de los métodos actuales plantean el análisis químico o instrumental haciendo uso de algunos analitos como indicativos, un perfil de proteínas para caracterizar variedades puras [31,49] y en mezclas usando la espectroscopia infrarroja. [38,44]

En México se produce hasta ahora, un 96% de café Arábica, teniendo mayor valor en el mercado internacional, y un 4% de Robusta, destinado al consumo nacional. Los principales estados productores de café en nuestro país son: Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Nayarit, Colima, Jalisco, Querétaro y Tabasco. [7] El precio, se rige por las cotizaciones de la Bolsa de Nueva York, así como por los vaivenes que originan la oferta y la demanda del mismo, propiciando que este se modifique constantemente. En el caso de la especie Arábica, hasta el mes de Octubre del 2009, tenía un valor comercial de \$8.44 pesos (MN) por kilogramo; sin embargo ya procesado alcanza un costo de \$350.00 pesos (MN); mientras que el Robusta cuenta con un precio de \$4.24 pesos (MN) por kilogramo. Por esta razón se hace necesaria una metodología que nos permita evitar posibles fraudes o adulteraciones de diferentes productos, enmascarando al café Robusta como Arábica, pues hay que recordar la diferencia en costos. Es interesante darse una idea de la calidad del café mexicano, pues en los últimos años, el consumo se

ha incrementado en un promedio de 2% por año, pues el aumento de la población aunado a un mayor poder adquisitivo y a las fuertes campañas publicitarias son factores que han favorecido al consumo interno, al igual de una apertura de firmas y tiendas especializadas, cuya oferta va dirigida, principalmente a los jóvenes y profesionales de clase media. [7,8]

Actualmente los parámetros indicadores de una buena o mala calidad en el café son; la acidez, el aroma, el cuerpo y el sabor, estos atributos se evalúan, de acuerdo a pruebas sensoriales, llevadas a cabo por catadores internacionales, llenando formularios, detectando sabores no propios, o bien identificando defectos como un sabor fermentado, etc., [13] sin embargo tales no son capaces de probar un posible fraude entre mezclas de variedades en cantidades mínimas, ni mucho menos proporcionar un posible porcentaje.

Básicamente, hay dos tipos de falsificación: la mezcla de dos especies de distinto valor económico o adulteración con similares del café [57]. Como mejor alternativa presento una de las técnicas basadas en el análisis de DNA, la Reacción en Cadena de la Polimerasa, debido a que es una técnica sensible y reproducible, capaz de ofrecer resultados aún cuando la cantidad de DNA sea escasa o se encuentre degradada, éstos efectos serán minimizados en el análisis, al utilizar el DNA del cloroplasto de una de las variedades de café, [19,52] pues por su alto número de copias, aumenta la posibilidad de obtener amplificados intactos de una región específica del genoma. [43,56]

CAPÍTULO 1. EL CAFÉ

1.1 Historia y Generalidades del café

El café es una bebida de carácter universal consumida en todos los países del mundo. Su origen fue Etiopía, en el África Oriental, en la provincia de «Kaffa», de cuyo nombre se deriva el café. En la edad media, el arbusto producía unas semillas aromáticas que los marineros africanos llevaron a la península de Arabia, país donde se creó su cultivo. De Arabia lo llevaron a Europa, donde su consumo tardó en aceptarse y extenderse. Sobre él, existen múltiples leyendas; una de ellas, es que a principios del siglo XV, unos monjes abisinios (Abisinia es la actual Etiopía) observaron que las ovejas de los pastores, se mantenían despiertas y excitadas, por lo que quisieron conocer el motivo, no tardando en comprobar que la causa se debía a que estos rumiantes masticaban grandes cantidades de un arbusto desconocido. Investigando las semillas, observaron que después de hervirlas en agua y tomar la infusión resultante, a los monjes les era imposible conciliar el sueño. A partir de entonces, comenzaron con el consumo del café para estar en vigila en momentos de rezos y ayuno. [17,24]

En la actualidad dos tercios de todo el café se cultivan en América Latina donde llegó vía Europa en el siglo XVIII. De las numerosas especies de cafeto, sólo tres son de importancia comercial pero dos solamente se utilizan ampliamente, *Coffea arabica* es la que más se cultiva teniendo mayor demanda. *C. robusta* es más resistente e importante en la preparación de mezclas utilizándose para café instantáneo. Y *C. liberica*, también resistente y de tierras bajas. [17,24]

Linneo aproximadamente en 1737, clasificó el cafeto en un grupo de plantas afines y creó el género *Coffea*. Más tarde Jussie, lo incorporó dentro de la familia de las Rubiáceas (ver tabla 1), la cual posee, más 500 géneros y de 6 a 8 mil especies descritas, además que al género *Coffea* pertenecen unas sesenta especies. [20]

1.2 Clasificación botánica del café

Tabla 1. Clasificación botánica del café. [25]

Reino	Plantae
Tipo	Espermatofitas
Sub-tipo	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas
Sub-clase	Gamopétalas inferioriadas
Orden	Rubiales
Familia	Rubiáceas
Género	Coffea
Sub-género	Eucoffea
Especies	Arábica, Canephora, Liberica

1.3 Especies existentes y Características

Como se mencionó, solo dos especies se utilizan ampliamente, *C. arabica* y *C. robusta*.

La especie *C. arabica*, o Arábica, es un arbusto originario de Etiopía, que alcanza hasta los 12 metros de altura en estado silvestre, es la principal especie cultivada para la producción de café, posee ramas redondeadas. Su porte es poco erguido cuando joven, pero en desarrollo es horizontal o caedizo. Sus hojas son opuestas, enteras, de forma ovalada y superficie rugosa. Las flores son blancas, agrupándose en 2 ó 3. El fruto es una drupa esférica u oval, carnosa, que contiene 2 semillas convexas en su cara dorsal marcadas con un surco profundo en la ventral. Su cultivo tiene gran importancia económica en África y América. Cultivada a una altura de los 1200 hasta los 1700 metros de altura. [17]

La especie *C. canephora*, o Robusta, es nativa de los bosques de África occidental. Se trata de un árbol o arbusto liso, con hojas anchas, a veces adquieren una apariencia corrugada u ondulante, cortas. Tiene flores blancas difusas con rosa, en dos racimos. Distintos tipos de robusta probaron estar mejor adaptados para las tierras bajas, cálidas y húmedas, donde había fallado la *C. arabica*. Aunque se descubrió que la calidad del grano robusta es inferior. Sin embargo, muestra algunas características favorables: a) inmunidad o gran resistencia a hongos, mencionando que el sabor del grano es más amargo comparado con el de otras especies, b) gran capacidad productora y c) capacidad para retener la fruta en el árbol por tiempo después de su madurez. [17]

El clima más favorable para el cultivo, se localiza entre el trópico de cáncer y el trópico de capricornio (ver figura 1), las plantaciones encontradas dentro de esta franja proporcionan la mejor calidad mientras que las que se encuentran fuera son marginales para el cultivo. [20,47]

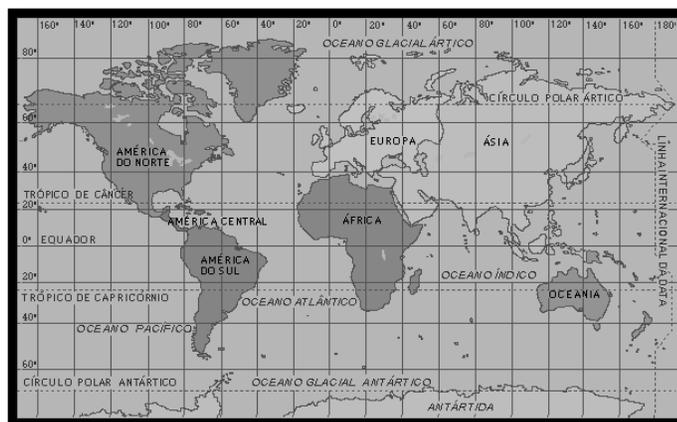


Figura 1. Franja del trópico de Cáncer y de Capricornio. [20]

Dentro de la franja, las zonas adecuadas para el cultivo de café están determinadas por el clima, el suelo y la altitud. El cafeto necesita temperaturas en promedio de 20°C, no mayor de 26°C ni menor de 16°C; las precipitaciones pluviales fluctúan entre 1,200 y 1800 mm anuales, distribuidos durante todo el año, no obstante debe existir una estación seca para permitir la floración y alturas que van desde los 1200 hasta los 1700 metros. [20,47]

1.4 Composición química

Tabla 2. Composición química de la especie Arábica y Robusta en grano verde.

[17, 24, 32, 34]

Componente	Arábica (<i>Coffea arábica</i>)	Robusta (<i>Coffea canephora</i>)
Minerales	3.0-4.2	4.0-4.5
Cafeína	0.9-1.2	1.6-2.4
Trigonelina	1.0-1.2	0.6-0.75
Lípidos	12.0-18.0	9.0-13.0
Ácidos clorogénicos	5.5-8.0	7.0-10.0
Ácidos alifáticos	1.5-2.0	1.5-2.0
Oligosacáridos	6.0-8.0	5.0-7.0
Polisacáridos	50.0-55.0	37.0-47.0
Aminoácidos	2.0	2.0
Proteínas	11.0-13.0	11.0-13.0

Sustancias Minerales

K, Mg, Ca, Na, Fe, Mn, Rb, Zn, Cu, Sr. Algunos autores señalan la importancia de estos minerales en el crecimiento y desarrollo estructural de la planta al igual de la semilla de café. En algunos casos forman parte de estructuras químicas tales como carbohidratos, proteínas y lípidos. En el caso del café tostado se habla de su contribución en el sabor. La presencia de estos minerales es mayor en el café Robusta y aún mucho mayor en el café tostado, esto se puede deducir ya que no existe gran pérdida pues el 90% se extrae en la preparación de café soluble. [17,24,32, 34]

Componentes del nitrógeno

Se aplica estrictamente a todos los compuestos que contienen nitrógeno orgánico e inorgánico como son los alcaloides, proteínas y aminoácidos. [17, 24, 32, 34]

Cafeína

Es el principal alcaloide del grano de café, al cual se le atribuye la actividad estimulante de la bebida. La variedad Robusta cuenta con un mayor contenido. También están presentes pequeñas cantidades de teobromina (1.5-2.5 ppm) y

trazas de teofilina. La trigonelina, una metil betaína de la piridina se halla en mayor concentración en el café Arábica (1.0-1.2%) su importancia radica en ser un componente relacionado con la niacina, la cual muestra ser una potencia como vitamina [58].

El procesamiento del café verde y la descafeinización tienen poco efecto sobre el contenido de trigonelina pero la tostación causa una destrucción progresiva del 50-80%, los productos de degradación incluyen la niacina y nicotidamida y una cantidad de compuestos volátiles contribuidores del aroma como la piridina y los pirroles.

Proteínas y aminoácidos libres

En el caso del café verde las proteínas están presentes en una forma no unida en el citoplasma o unidas a polisacáridos en las paredes celulares, una fracción de proteína es soluble en agua (albúmina), la cual constituye la mitad del contenido total y una fracción es insoluble (globulinas). Durante el proceso de tostado las proteínas se desnaturalizan y se degradan para producir fragmentos de bajo peso molecular. Adicionalmente algunas reaccionan con carbohidratos (reacción de Millard) e incluso con compuestos fenólicos, para producir compuestos que contribuyen al aroma y a la coloración del café. [17, 24, 32, 34, 50]

Enzimas

Glicosidasas, proteasas y lipasas. Durante el proceso de tostado estas enzimas son desnaturalizadas y degradadas resultando en una pérdida de su actividad. Mientras que durante el procesamiento y almacenamiento del grano pueden producir cambios, como la producción de varias agliconas, aminoácidos libres y ácidos grasos libres que contribuyen a la calidad de la bebida.

Además de la existencia de polifenol oxidasas las cuales catalizan la oxidación de ácidos fenólicos contribuyendo a la coloración.

Lípidos

Los lípidos del café verde están compuestos en su mayor parte de aceite principalmente en el endospermo, y una pequeña cantidad de cera presente en las paredes externas del grano, se les considera un importante vehículo para el aroma del café tostado, pero es poco el que pasa al café soluble (1.5-1.6%).

Lípidos saponificables

Los lípidos crudos del grano de café verde contienen entre un 70-80% de triglicéridos, algunos ácidos grasos libres están presentes en una concentración de 0.5-3.0% en granos de buena calidad, pero esta cantidad aumenta a 20% en granos de baja calidad debido a procesos de degradación oxidativa. El proceso de tostado incrementa la concentración de ácidos grasos libres entre un 30-400%, el valor indica un aumento posiblemente en la actividad de la lipasa durante las primeras etapas del tostado.

Entre los ácidos grasos encontrados en el grano verde de café están el ácido linoleico, el palmítico el oleico, el linoleico y el arquídico así como trazas de ácido mirístico, entre otros.

Lípidos insaponificables

El aceite de los granos de café de ambas variedades contiene entre un 7 y 20% de materia insaponificable, la cual es la responsable de este bajo punto de fusión de este aceite (8°C). Entre ellos esteroides, serotonina e hidrocarburos alifáticos.

Compuestos fenólicos

Los ácidos clorogénicos son el principal grupo. El café Robusta contiene entre 7-10% y el Arábica entre 5.5-8.0%. Estos compuestos son considerados como productos secundarios de la planta ya que no tienen participación directa en las actividades bioquímicas primarias, su contenido revela ser mayor en el grano que en los demás tejidos por lo que su presencia se atribuye a la disuasión de predadores, mamíferos, pájaros; así como en la protección contra invasión microbiana.

Una gran cantidad de estos ácidos y de sus productos de degradación debido al tostado, se une a las proteínas para formar ácidos húmicos.

Ácidos Alifáticos

Los granos de café verde contienen ácidos no volátiles incluyendo al cítrico, oxálico, málico y tartárico, mientras que por el proceso de tostado se forman 34 ácidos alifáticos los cuales comprenden 15 ácidos volátiles y el resto no volátil.

Carbohidratos

Son los principales constituyentes de los granos de café verde, participan como precursores del aroma, mejoran la calidad organoléptica de la bebida contribuyendo a su viscosidad, imparten estabilidad a la espuma y participan en la formación de sedimentos en el café soluble, durante en proceso de tostado sufren cambios complejos que contribuyen al sabor de la bebida.

Los granos de café verde contienen carbohidratos subdivisibles en polisacáridos y en azúcares de bajo peso molecular entre los que encontramos tri-, di-, y monosacáridos.

El contenido de ellos en base seca es del 45-60% en grano verde, de 40-50% en el grano tostado y del 30-45% en el café soluble. El principal carbohidrato de bajo peso molecular es la sacarosa mientras que los galactomananos lo son como polisacáridos seguidos por arabinogalactanos, celulosa y pectina.

La composición química de los granos de café (ver tabla 2) se altera por el proceso de tostado (ver tabla 3), pierde gran cantidad de agua (contenido de 1% a 5%), proteínas, ácidos clorogénicos y carbohidratos. Ocurren transformaciones químicas y se forman cientos de sustancias volátiles, como los gases que conforman el aroma, pigmentos poliméricos y melanoidinas. Los lípidos son parte importante. El aceite se concentra en el endospermo, el resto (0,2% a 0,3%) se encuentra en la capa externa de la semilla. La presencia de estas han recibido la categoría de «sustancias irritantes», a las cuales algunas personas son más sensibles.

Tabla 3. Composición química del café en grano tostado. [13,24]

Arábica (<i>Coffea arábica</i>)		Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	
Componente	porcentaje %	Componente	porcentaje %
Cafeína	1.3	Cafeína	2.4
Minerales	4.5	Minerales	4.7
Lípidos	17	Lípidos	11
Trigonelinas	1	Trigonelinas	0.7
Proteínas	10	Proteínas	10
Ácidos Alifáticos	2.4	Ácidos Alifáticos	2.5
Ácidos Clorogénicos	2.7	Ácidos Clorogénicos	3.1
Carbohidratos	38	Carbohidratos	41.5
Aromas volátiles	0.1	Aromas volátiles	0.1
Melanoidinas	23	Melanoidinas	23

1.5 Cultivo del café

Antes de dar inicio a la plantación del cafeto, es necesario asegurarse de que el terreno elegido reúne ciertas condiciones. En cuanto a la temperatura, el café se produce en tierras templadas y calientes, no obstante la duración de la plantación, la cantidad y calidad de sus granos varían con ella, el rango propicio para su desarrollo está de los 18 a los 22°C. [33,47]

Semillero y Vivero

Se le llama semillero a la parte donde germina el grano de café. Posteriormente se traslada al vivero donde se siembran y desarrollan los arbolitos, hasta alcanzar una altura y fuerza convenientes, para poder trasladarlos al lugar que deben ocupar en la plantación. [33,47]

Transporte

El transporte de los cafetos se realiza con raíces y terrón, para evitar su rompimiento. [33,47]

Recolección del Fruto

El fruto debe ser recolectado cuando esté completamente maduro. Es decir que la baya tenga un color rojo brillante, parecido al vino tinto. El fruto debe despulsarse a medida que se recolecta, porque puede fermentarse y afectar la calidad del grano.

[33,47]

1.6 Tecnología y Procesado del café

Los granos de café, pueden procesarse bajo dos métodos; a) beneficio húmedo, donde así tratados reciben la denominación de café lavado “suave”, o b) beneficio seco y se le llama café natural. [38,44]

a) Proceso en beneficio Húmedo

En el beneficio húmedo (ver figura 2), la primera operación que se realiza es la recepción, para esto, lo ideal es que se reciba solo fruto maduro (baya con un color rojo brillante), se recolecta en forma manual, y se debe despulsar el mismo día, puesto que después de las 24 horas, pueden presentarse manchas en el pergamino debido a la oxidación de los taninos presentes en el mucílago. El despulpado, consiste en pasar las bayas por una máquina que arranca la cáscara exterior y el mucílago, pero deja intacto el grano y las capas que lo protegen. [34, 42,49]

Las semillas frescas despulpadas aún cuentan con una pequeña parte del mucílago (miel, goma, etc.), ésta se elimina por fermentación, antes de que la semilla se seque. Las semillas son puestas a fermentar ya sean húmedas o completamente sumergidas en agua. La descomposición de la capa antes mencionada (insoluble en agua) puede durar entre las 12 y las 30 horas, esto tomando en cuenta diversos factores como; la temperatura, la madurez del grano de café, el diseño del tanque y la calidad de agua utilizada. Después de esta operación el café es lavado por lo menos dos veces con la finalidad de la eliminación total del mucílago y posteriormente es clasificado pudiendo ser; café tipo exportación, café corriente y pasilla o grano de baja densidad. Después del lavado el café se somete al secado

natural o mecánico, hasta llegar a un 12% de humedad, luego se almacena en forma de café pergamino o café verde si es que se pasó por la trilla. [34, 42,49]

La clasificación del café verde se lleva tomando en cuenta la calidad, forma, tamaño y exigencias del mercado exterior. En México se clasifica en once calidades según por su granulometría y serie de defectos en el grano (ver tabla 4).

Tabla 4. Calidad del café en México. [12,46]

Calidades en México	Robusta natural
Estrictamente Altura	Lavado
Altura	Desmanche
Extra prima lavado	Natural tipo A
Prima lavado	Natural tipo B
Buen lavado	Robusta lavado

Forma

Las diferencias notables entre un grano de la variedad Arábica y uno de Robusta son en la forma y el tamaño. Las primeras son más voluminosas y alargadas, mientras que la Robusta es más redondeada, de un grano corto al igual de contar con un surco más rectilíneo. [49]

Densidad Aparente

La diferencia reside en el origen botánico y en una menor proporción al contenido de humedad. La densidad de la variedad Robusta es mayor que la Arábica. [49]

Independientemente del factor agua, las diferencias dependen del estado de madurez del grano cuando es cosechado, los ataques por parásitos, las alteraciones en los tejidos, etc. [49]

Color

Esta característica es de gran importancia comercial, sobre todo en el Arábica. El tipo de beneficio desempeña un importante papel en el color, variando entre amarillo claro y verde oscuro, el cual es reflejado por el origen botánico, la naturaleza del suelo, la técnica de cultivo, la manera de almacenamiento y conservación. [49]

Contenido de humedad

Oscila entre el 10 y el 12% en café verde. [44]

Almacenamiento del grano

El café puede ser almacenado con pergamino o como café verde. Para que su calidad no se vea afectada se tienen que tener en cuenta factores como; la humedad inicial del grano, la humedad relativa, la temperatura, los insectos, los microorganismos presentes, y la respiración de los granos. [49]

Como se mencionó la humedad debe estar entre el 10 y el 12% en grano verde, para evitar la actividad enzimática y el crecimiento del moho, el cual depende también de la humedad relativa (entre 50 y 70%) y la temperatura (no mayor a 20°C) del medio que lo rodea. Es importante tener un control permanente de dichos parámetros, debido a que una humedad relativa alta genera el crecimiento de microorganismos (hongos y bacterias), los cuales afectan la calidad del grano. Se tiene que tomar en cuenta que el café verde aún tras su proceso, es un organismo vivo, por lo tanto transpira siguiendo su metabolismo, experimentando cambios físicos y químicos. [49]

A continuación, se presenta el diagrama de bloques, para ilustrar el proceso de beneficio húmedo del café.

Beneficio húmedo

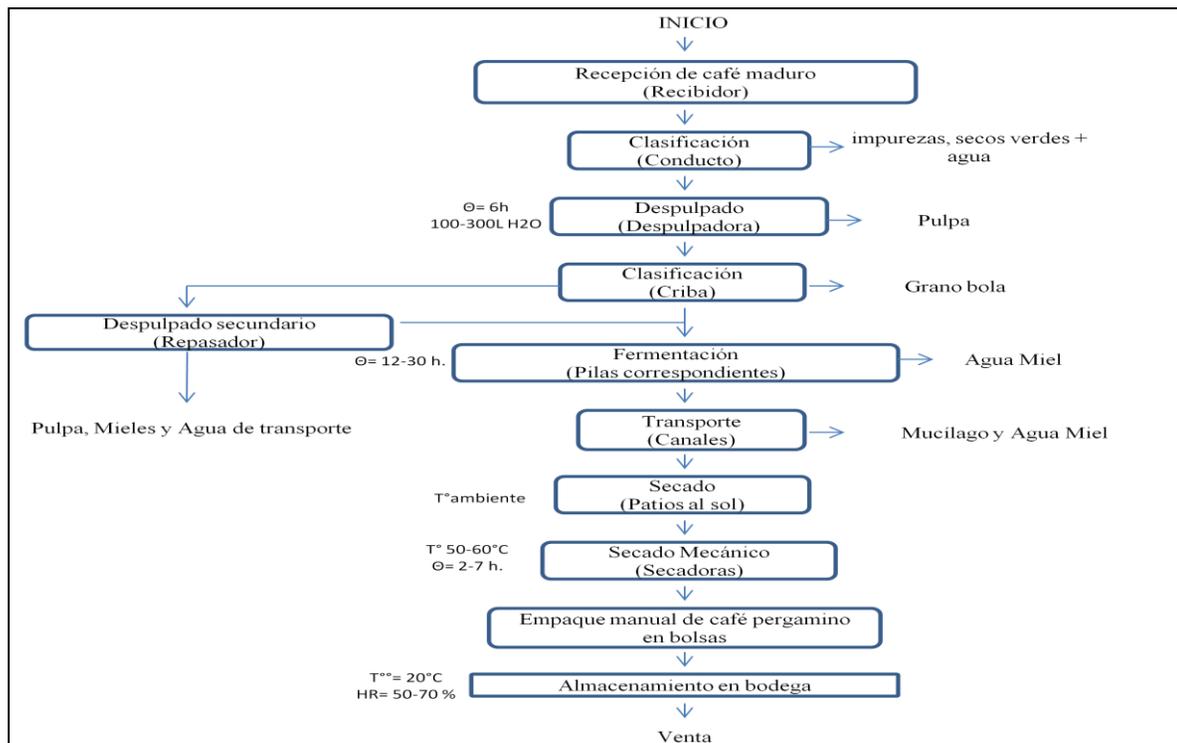


Figura 2. Proceso en beneficio húmedo del café. [34, 49]

b) Proceso en beneficio Seco

Se utilizan dos métodos de secado (ver figura 3), el secado al sol o el secado mecánico por medio de aire caliente, en cuanto al primero, los granos húmedos se extienden en una capa delgada y se mezclan ocasionalmente para darles un secado uniforme. Después de cuatro a siete semanas bajo el sol, se habrá bajado el contenido de humedad hasta los niveles deseados, es decir al 12%. Aunque se considera que se obtiene un producto ligeramente mejor, el secado al sol requiere considerable espacio, tiempo y mano de obra; por lo que muchas fincas utilizan secadores rotatorios. Se pasa una corriente de aire caliente de 80 a 85°C sobre los granos húmedos, durante las primeras horas, después de lo cual se mantiene una temperatura de 75°C. El secado se completa de 20 a 24 horas. Algunas fábricas prefieren combinar los dos métodos; los granos se extienden al sol por unos cuantos días y el proceso se completa en una secadora mecánica. Y por último se considera

el almacenamiento, en el que los granos de café son colocados en sacos limpios, registrando el peso total entregado por productor, respecto a las condiciones para salvaguardarlo, debe ser un lugar seco, bien ventilado, sobre tarimas de madera, determinándose la pérdida o ganancia de peso. [42,49]

El beneficio seco aparte de representar la forma tradicional de procesamiento de café cereza, se distingue del beneficio húmedo por la eliminación de actividades como el despulpado y lavado. El grano de café se cosecha e inmediatamente después comienza el secado, éste se lleva a cabo al aire bajo el sol durante dos semanas o más, tomando en cuenta que la humedad inicial es de entre el 60 y 65%. En caso de hacer uso de un secador dinámico, se recomienda realizar un pre secado al sol hasta reducir la humedad a un 30 o 35% lo que permitirá tener una mayor eficiencia del secador. El proceso de secado termina cuando el grano llega a un 12%, momento en el que se somete a la trilla para separar la pulpa seca y el pergamino, quedando lo que se denomina café verde. [38,45] A continuación, se presenta el diagrama de bloques, para ilustrar el proceso de beneficio seco del café.

Beneficio seco

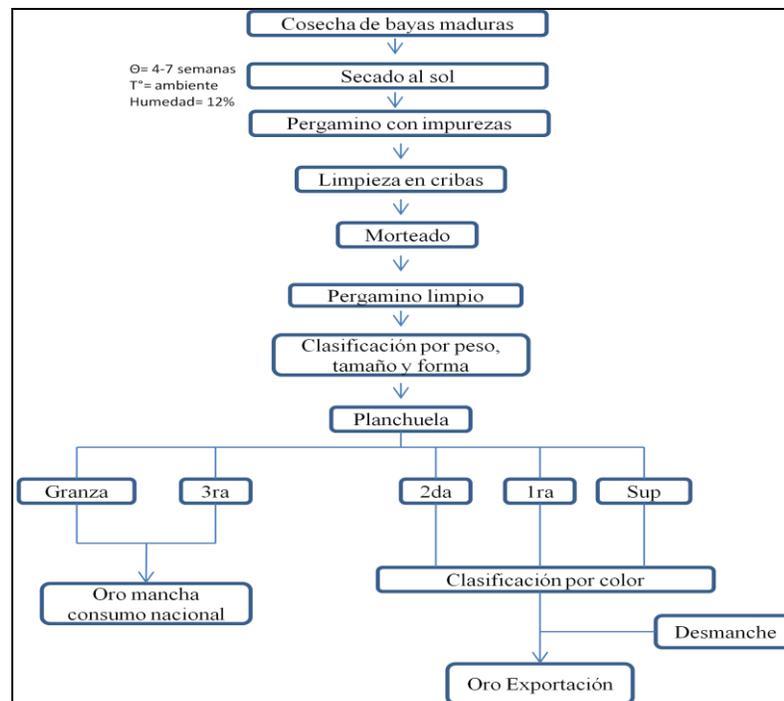


Figura 3. Proceso en beneficio seco del café. [49]

Tostado o torrefacción del café

Es un proceso en el cual existe una transferencia de calor y de masa simultáneamente, producto del control de dos variables, como son; la temperatura y el tiempo, las cuales le confieren al café verde; el aroma, el sabor, el color y el cuerpo. Su composición se ve modificada de forma física y química. [40, 42, 49]

Fases principales de la Torrefacción

Desecación, Crecimiento, Disgregación, Tostado completo y Enfriamiento.

Alrededor de los 50°C se presentan los primeros cambios en las capas superficiales. A los 100°C se puede apreciar que el grano verde pasa a un color amarillento, volatilizándose un aroma a pan tostado, empezando la desecación debido a la evaporación del agua contenida. De los 120 a 130°C, el color se torna castaño variando poco a poco adquiriendo tonalidades pardas, acompañado del aumento de volumen, aun sin olor característico. Mientras que aproximadamente a los 180°C se comienza a definir el olor, y a causa de la descomposición de grandes estructuras químicas por efecto del calor, aparecen productos gaseosos como; vapor de agua, CO₂ y CO; compuestos volátiles generados por la descomposición de carbohidratos, proteínas y grasas, causantes del aumento del volumen del grano, el cual adquiere la coloración marrón debido a las reacciones de Maillard, y a la caramelización de los azúcares. En éste momento se da el rompimiento de la estructura celular del grano por la sobrepresión interna, la producción de humo y la aparición del aroma del café, en éste instante las reacciones endotérmicas están a nivel máximo. [40, 42, 49]

De manera posterior comienzan las reacciones exotérmicas, debido al calor de reacción dentro del grano, que hacen que alcance una temperatura de hasta los 200°C. Después de la caramelización de los azúcares se alcanza el tostado completo, en donde el contenido de agua desciende a valores de entre 1.5% y el 3.5% en peso. [40, 42, 49]

La zona de torrefacción se encuentra entre los 180 a 250°C, siendo la temperatura óptima la comprendida entre los 220°C y los 230°C, [57] por encima de esto se da la

sobre torrefacción, la cual se distingue por la excesiva producción de humo, el ennegrecimiento o carbonización de los granos, se hacen quebradizos, el volumen ya no aumenta y hay pérdida del olor. [40, 42, 49]

Para detener el proceso de torrefacción se recurre al enfriamiento rápido de los granos, por medio de una corriente de aire, o por apagado por aspersion de agua. [40, 42, 49]

Modificaciones físicas

Volumen

Se ve aumentado entre los 1.8 ó 2 veces, debido al CO₂ producido al interior del grano, debe evitarse el llenado excesivo del tostador, para facilitar el movimiento del café. Este fenómeno se da por la combustión de carbohidratos, proteínas y grasas presentes. La cascarilla del interior es liberada por el crujido y como consecuencia se da el secado de las paredes celulares, descendiendo su elasticidad e incrementando su tención intercelular. [49]

Pérdida de Peso

Se da una pérdida de peso variando de un 15 a un 20%, esto no solamente por la evaporación de agua del grano, sino también por el desprendimiento de sustancias volátiles, debido a la pirolisis de estructuras macromoleculares, así como al quebranto de la capa plateada y a estructuras de bajo peso molecular. [49]

Color

Varía de acuerdo al tiempo de tostado, la temperatura y el tipo de café, pasando de un color amarillento a un color marrón oscuro, o en ciertos casos a negro. Este parámetro es proporcional a la pérdida de peso y al aumento en el volumen, cambios que dependen de la intensidad y duración del proceso. Al salir de la etapa de tostado y ser enfriados los granos sufren un cambio en el matiz del color, siendo más acentuado. [49]

El color es uno de los parámetros indicadores del grado de torrefacción. Actualmente han sido asignados diferentes nombres dependiendo del grado de tueste; claro, medio, oscuro y muy oscuro. [49]

Dureza

El grano verde de café es muy resistente a la presión sin embargo el ya tostado no, a causa de las fisuras en el interior. Durante el enfriamiento los aceites presentes se solidifican, haciendo que éste pase de elástico a quebradizo y fácil de moler, su estructura se vuelve porosa. [49]

Contenido de Humedad

En el café verde varía de un 10 a un 12%, mientras que por la torrefacción se dan pérdidas de entre .4 y 5%, dependiendo del grado de ésta etapa. El agua que forma parte del grano se encuentra en forma libre y ligada, se halla combinada con otros componentes como proteínas, carbohidratos, etc., ésta permanece aun a temperaturas altas que carbonizan al café. Aproximadamente la mitad de la pérdida de peso se debe a la evaporación de agua, éste parámetro es de gran importancia, ya que:

- Es de gran influencia durante el almacenamiento del grano.
- Provee un seguimiento durante su procesamiento.

Hay tres etapas en las que se tiene que tomar en cuenta el contenido de humedad del café tostado; cuando el grano entero está en almacenamiento, después de la molienda y después del empaque. [49]

Sólidos solubles

Contribuyen al sabor y carácter de la taza de café. La concentración de la bebida depende de la cantidad de sólidos presentes, que forman parte de ella después de la extracción. [49]

Modificaciones Químicas

A causa de la temperatura durante el proceso de torrefacción, se producen diversas reacciones que dan origen a infinidad de compuestos químicos, que conceden atributos a la bebida. Esto, como se mencionó anteriormente en proteínas, carbohidratos, grasas, etc. [49]

Proteínas. Por el efecto de la temperatura se desnaturalizan dando origen a ácidos. Se transforman tanto que casi ningún residuo suele encontrarse, de manera natural pueden encontrarse en el café verde. [49]

Carbohidratos. Los azúcares presentes son caramelizados, y dan pie a las reacciones de Maillard. La sacarosa presente se deshidrata y al final se hidroliza en azúcares reductores posteriormente polimerizados, este componente se solubiliza durante la extracción. [49]

Grasas y Aceites. Bajo la influencia del calor son liberadas, evidenciándose en la exudación del grano (aceites esenciales): Esta materia grasa ayuda a fijar principios aromáticos y al solidificarse hacen al café más quebradizo. [49]

Ácidos. Subsisten tras el tueste, formándose a partir del efecto de la temperatura sobre los carbohidratos, desempeñando una función importante en el aroma y sabor de la bebida. [49]

Taninos. Son degradados liberando la cafeína retenida en un principio. [49]

Minerales. Funcionan como catalizadores durante las reacciones de pirolisis, y son encontrados posteriormente en forma de sales orgánicas. [49]

Dióxido de Carbono. No existe en forma libre al interior del grano y se genera durante la combustión de los componentes. [49]

1.7 Situación actual del café en México

La producción de café en México ha disminuido en los últimos años. Pasó de ser el 5º al 7º productor mundial del aromático, esto debido a varios factores:

- Los bajos precios internacionales y los altos costos de producción y proceso.
- La escasa mano de obra.
- La falta de posicionamiento del café nacional en el extranjero y el lento aumento en el consumo nacional, aun con la entrada de grandes franquicias.
- La escasa o nula participación del gobierno para dar programas de apoyo que ayuden a convertirse en productores de granos de calidad.

Hasta este momento, la cadena productiva nacional ha recibido fuertes golpes del extranjero como: castigos, rechazos, precios bajos y poco posicionamiento a nivel internacional, antes de empezar una ardua transformación en los controles de calidad. Los mercados externos exigieron mejor calidad forzando a implementar prácticas de manejo. Dentro del país, los cambios fueron del exportador hacia el productor. [7,8]

Pocos son los productores nacionales que han logrado posicionar su café en el mercado internacional, son ellos quienes obtienen precios arriba del contrato "C" de Nueva York, aquellos que han entendido el valor de la calidad, el cual es indispensable para lograr mejores mercados. Otros, han logrado colocarlo a mejores precios, buscando mercados diferenciados como el orgánico, o han recurrido a asociaciones comerciales con empresas transnacionales que les garantizan un mejor precio. [7,8]

1.7.1 Producción, Exportación, Importación y Consumo Nacional de café

México produce café de excelente calidad, ya que su topografía, altura, climas y suelos le permiten cultivar y producir variedades clasificadas dentro de las mejores del mundo. La variedad que se produce en México en mayor proporción es la "Arábica", clasificándose dentro del grupo de "otros suaves". [7,8]

Se produce sobre una superficie de 761 mil hectáreas en doce estados de la República Mexicana, situados en la parte centro-sur del país. Estos estados son: Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz. [7,8]

Industriales nacionales señalan que países como Estados Unidos de Norteamérica y Alemania compran grano verde mexicano (ver tabla 5), le dan un valor agregado (clase, tostado y empaque) y lo reexportan de nuevo a México, pues gracias a la falta de infraestructura y la ineficaz distribución actual no se ha permitido que la característica de valor agregado se integre dentro de la cadena de producción. [7,8]

Tabla 5. Destino de las exportaciones mexicanas. [7,8]

País	Cantidad (Kg)	Porcentaje (%)
E. U. A	9,980,570.00	63.14
Alemania	1,582,815.00	10.01
Bélgica	1,516,723.00	9.6
Japón	748,656.00	4.74
Cuba	305,280.00	1.93
Canadá	294,492	1.86
Francia	246,675.00	1.56
Australia	144,026.00	0.91
Dinamarca	140,375.00	0.89
Noruega	132,825.00	0.84
Otros	714,220.00	4.52
TOTAL	15,806,657.00	100

1.7.2 Producción, Exportación, Importación y Consumo Mundial de café

El café es uno de los principales productos que se comercializan en el mercado, su producción se realiza por lo regular en las zonas tropicales. Actualmente más de 80 países lo cultivan en sus diferentes tipos, de los cuales poco más de 50 países lo exportan. [8,17] Por el valor que representa, llega a generar ingresos anuales superiores a los 15 mil millones de dólares para los países exportadores y da ocupación directa e indirecta a poco más de 20 millones de personas dedicadas al cultivo, transformación, procesamiento y comercialización del producto. La producción mundial actualmente es 24.7% mayor que la de principios de la década de los ochenta. Los principales productores de café a nivel mundial son (ver figura 4); Brasil, México, Colombia, Guatemala, Etiopía, Perú, Honduras, Costa Rica, Vietnam, Indonesia, Uganda y la India. [8,17]

Se integra por tres tipos básicos: los suaves, los arábigos, y los robusta, los primeros son procesados por medio del método de lavado (despulpado, lavado y secado inmediatamente después de haber sido recolectado); los segundos generalmente son no lavados (el grano recolectado se seca y almacena con su pulpa o cáscara exterior, y se despulpa con posterioridad antes de ser entregado al comprador) y su calidad es inferior a la de los suaves; finalmente, los del tercer tipo, son los menos cotizados, tanto por calidad como por su precio. Las exportaciones mundiales durante los seis primeros meses del año cafetero 2007/08 (octubre 2007 – marzo 2008) descendieron un 4,9% en comparación con la cifra correspondiente al mismo período del año cafetero 2006/07. Mientras que las importaciones globales durante 2007 fueron de alrededor de 100 millones de sacos, el nivel más alto jamás registrado. Ese nivel de importaciones es un indicador del rápido crecimiento del consumo mundial y constituye un importante factor en cuanto a que los precios se mantengan firmes (ver figura 5). [8]

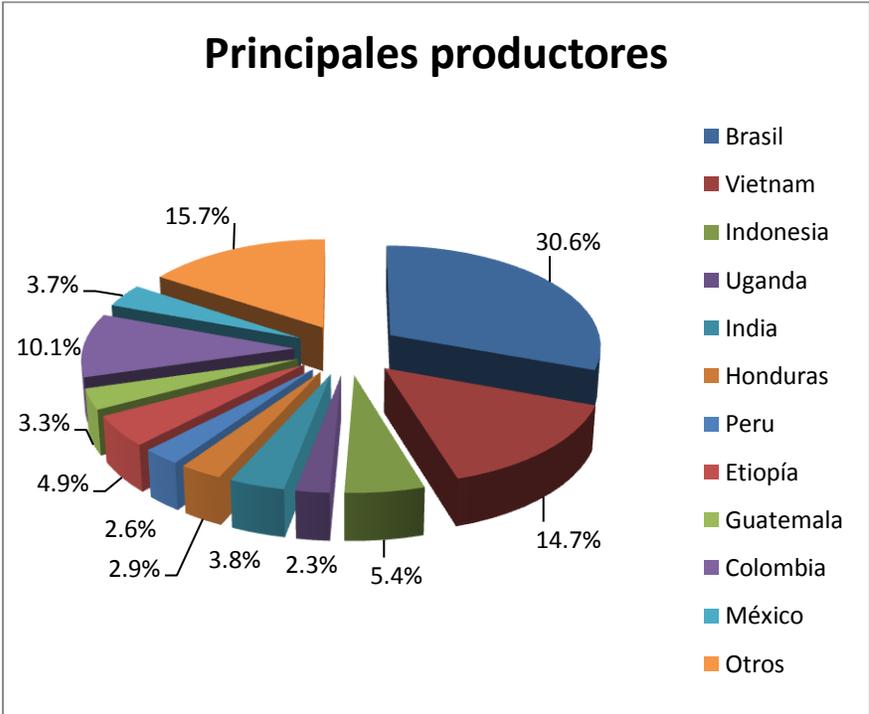
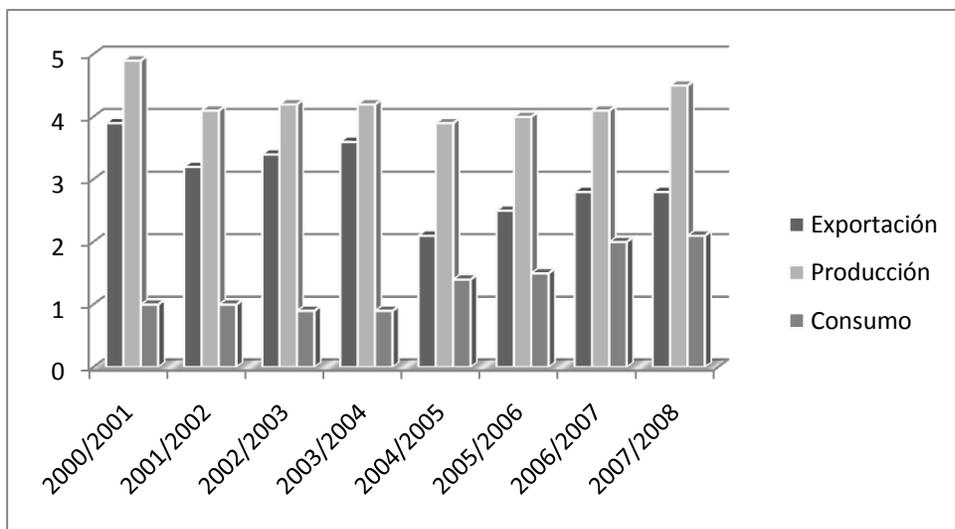


Figura 4. Países productores de café. [8]



Millones de sacos 60kg

Figura 5. Exportación, Producción y Consumo de café a nivel mundial. [8]

CAPÍTULO 2. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS EN LA AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS

2.1 Métodos utilizados para la autentificación de alimentos

El control de calidad es esencial en la industria alimentaria, en la actualidad se buscan métodos más eficaces para la satisfacción del consumidor y los requisitos normativos, en primera, con la finalidad de evitar sustituciones de materias primas de alta calidad con otras más baratas, y segundo para la prevención de un etiquetamiento incorrecto o ingredientes no declarados, entre otras más. [1] Por lo que a continuación se mencionan algunas técnicas utilizadas en la identificación y autentificación de alimentos evaluando sus posibles ventajas y desventajas.

2.1.1 Análisis de proteínas

Actualmente existe una gran variedad de técnicas analíticas, en las que predominan las basadas en el análisis de proteínas como son las que implican la separación de éstas por métodos electroforéticos en geles de poliacrilamida, [30] logrando la autenticidad de las especies cuando se comparan con un perfil propio; sin embargo

la mayoría de estas biomoléculas se desnaturalizan en los alimentos procesados térmicamente, resultando en cambios de la movilidad electroforética, lo que se traduce en una interpretación equívoca de los resultados.

El análisis de proteínas también es utilizado en el área inmunológica. Algunos de los métodos utilizados en la autenticación son el de **ELISA** y el **Western Blot**. [41]

La técnica de **ELISA** se fundamenta en el uso de anticuerpos (Ac) específicos para capturar a la proteína de interés, se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. [4,41]

- Ventajas

Es un ensayo que se caracteriza por ser muy sensible, de alta especificidad, rápido y económico.

- Desventajas

La poca existencia de proteína de interés puede pasar desapercibida y no ser medida, dando lugar a un falso negativo.

Pueden producirse falsos negativos cuando se desnaturalizan las proteínas por cambios de presión, temperatura o concentración de sales. Se requiere alta calidad de la proteína así como gran cantidad de ella presente.

La técnica de **Western Blot**

Técnica en la que las proteínas son separadas por electroforesis. La corrida se trasfiere a una membrana para luego incubarla con anticuerpos capaces de reconocer la proteína de interés. El reconocimiento se pone en evidencia mediante tinciones. [41]

- Ventajas

Es ideal para la detección de diferentes proteínas dentro de una matriz compleja, cuando las proteínas de interés son conocidas, es altamente específico y sensible.

- Desventajas

El tiempo invertido en la técnica es mayor en comparación con otras 48h.

En cuanto a la autenticidad del café, uno de los métodos ampliamente utilizado en la discriminación de especies es la **Espectroscopía Raman**.

Es una técnica fotónica que proporciona información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico, permitiendo así su identificación. El análisis se basa en el examen de la luz UV dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz inicial. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente, es decir experimenta un cambio en la frecuencia (energía y longitud de onda entre el fotón incidente y el emitido), frecuencia que es característica del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente. [11,48]

- Ventajas

Este análisis se lleva a cabo sobre el material en sí, no se necesita de su preparación especial, y no existe la alteración de la superficie sobre la cual se lleva a cabo, es decir es una prueba no-destructiva.

- Desventajas

Uno de los problemas encontrados, es el ruido presente (todos aquellos factores que pueden conducir a una lectura errónea de la incidencia de la luz sobre la muestra).

El uso de ecuaciones matemáticas complejas, entre otras.

2.1.2 Análisis de DNA. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Los métodos analíticos basados en la detección de DNA suelen utilizarse cuando el alimento ha sido procesado o bien tratado fisicoquímicamente (calor, presión, etc), ya que la proteína puede haberse desnaturalizado o degradado en el proceso y los métodos basados en el análisis de proteína se ven afectados por este hecho. El DNA

en cambio pudo haberse fragmentado a trozos pequeños por estas mismas condiciones, pero esto no implica que no pueda detectarse, aunque también se degrada por la esterilización aún es posible encontrar fragmentos para hacer posible la diferenciación de especies. El DNA es termoestable en comparación con otras proteínas, es menos susceptible a la degradación, está presente en las células de los organismos en gran cantidad de copias y en principio con la misma información independientemente del tejido. Las técnicas con marcadores de DNA son más sensibles, y las más utilizadas para la detección de dianas moleculares están basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y en la utilización de Fragmentos Largos de Restricción Polimórficos (RFLP). [41]

El análisis de PCR es un método enzimático que permite copiar de forma experimental una zona concreta de un genoma consiguiendo obtener hasta cien mil copias de ella de manera in vitro, después de realizar 30 o más ciclos. [8, 10, 24, 25, 31, 41] Fue diseñada por el Dr. Kary Mullis en 1987, para la obtención de un amplificado del gen de la hemoglobina humana. [5]

2.1.2.1 Fundamento de la PCR

Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de ADN. Usa, uno o dos oligonucleótidos sintéticos (primer o cebadores) según la técnica, generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco, diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (conocidos como ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del cebador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del cebador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN. Estos fragmentos se separan posteriormente mediante técnicas electroforéticas, obteniéndose un patrón de bandas específico que nos permite diferenciar individuos, especies animales o vegetales, etc. [9, 16, 26]

2.1.2.2 Etapas de la reacción

Cada ciclo consta de tres etapas o ciclos (ver figura 6):

- Desnaturalización,
- Hibridación y
- Extensión o elongación

Desnaturalización

Fase en la que el ADN se somete a altas temperaturas (aprox. 95°C), de 15 a 40 segundos dependiendo del tamaño del genoma, [9, 11, 26, 27, 35, 45] con la finalidad de que se separe y resulte en cadenas sencillas (ver figura 6).

Hibridación

La mezcla de la reacción se enfría (aprox. 60°C), dando lugar al reconocimiento de segmentos específicos de la cadena diana de ADN por los cebadores, un cebador se une a un extremo y el otro a la complementariedad, recordando que los sitios de hibridación se eligen de acuerdo a la región de interés, mientras que la temperatura y el tiempo varían entre cada pareja de cebadores (ver figura 6). [9, 11, 26, 27, 35, 45]

Extensión

La enzima Taq polimerasa es la encargada de leer la secuencia complementaria así como de sintetizar los nucleótidos faltantes durante “n” número de ciclos, para la obtención de gran cantidad de copias del fragmento de ADN deseado. La temperatura es de (aprox. 70°C) con tiempo de 1 ½ minutos que también puede variar según sea necesario (ver figura 6). [9, 11, 26, 27, 35, 45]

En la siguiente figura (ver figura 6) se pueden observar las tres etapas de la PCR.

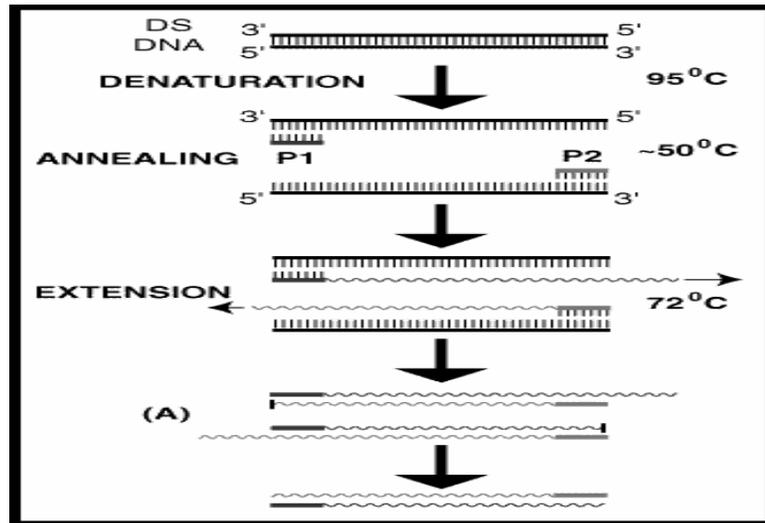


Figura 6. Ciclos de la PCR. [18]

2.1.2.3 Componentes de la Reacción

Para que se produzca la amplificación del fragmento esperado, en la mezcla de la reacción deben encontrarse los siguientes componentes: [9, 11, 26, 27, 35, 45]

- Fragmento de DNA que se desea amplificar. Puede provenir de distintos órganos, o de extracto de tejidos, o de sangre, o de mezcla de distintos fragmentos de ADN, etc.
- Los cuatro tipos de desoxirribonucleótidos trifosfatados -dATP, dGTP, dCTP y dTTP-.
- Dos oligonucleótidos de cadena sencilla que actuarán como cebadores o primer. Su selección es muy importante, pues de este paso depende el éxito de la PCR (ver tabla 6).
- Una DNA-polimerasa termoestable, ya que debe actuar a altas temperaturas (unos 75° C) y debe mantener su estructura estable a temperaturas de 95° C.

Tabla 6. Criterios de selección del primer

Tamaño	Tamaño ideal de 20 a 25 nucleótidos de longitud; general mente de 18 a 30.
Base en el extremo 3'	Debe ser una G o una C

Temperaturas de fusión (Tm)	50 – 65 °C
Contenido de GC	40-60%
Auto-complementariedad	Debe ser evitada
Similaridad	Debe de tener un apareamiento del 100% con el molde

La amplificación dura unas dos horas y es un proceso cíclico (de 20 a 40 ciclos). Cada ciclo dura entre un minuto y medio y cinco minutos. Cuantos más ciclos se realicen, más se amplificará el DNA. [3] En los puntos anteriores se comentó la esencia de la PCR, sin embargo para llevar a cabo el análisis se requieren de unos pasos previos y otros posteriores que constan de:

- Extracción del DNA total.
- Amplificación de una zona concreta de DNA.
- Visualización de los fragmentos amplificados en un equipo de electroforesis.

2.1.3 Análisis del producto obtenido de la PCR

El hecho de que las moléculas de DNA obtenidas al finalizar la reacción en cadena correspondan efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los primer que definen los extremos "derecho" e "izquierdo" de ese fragmento. Así, una vez que la reacción ha finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, a un proceso de separación bajo la acción de un campo eléctrico.

Las muestras son colocadas sobre un gel y sometidas a la acción de un campo eléctrico (electroforesis) migrando de una manera característica que se puede visualizar por tinción (coloreado) del DNA con bromuro de etidio, el cual actúa como intercalante y al ser analizado bajo la luz UV emite una fluorescencia anaranjada. [16]

Ventajas de la PCR

- A partir de una muestra pequeña de DNA (0.5 µg) se pueden realizar una gran cantidad de estudios.
- El producto se puede utilizar para clonar, secuenciar y análisis.
- Se puede amplificar DNA de cualquier organismo vivo o muerto.
- Sus aplicaciones son múltiples; medicina forense, diagnósticos, análisis prenatales, identificación de especies y discriminación, etc.
- Cuenta con una alta sensibilidad y especificidad.

Desventajas

- Susceptible a la contaminación, depende de la concentración y pureza del DNA extraído, así como de aditivos y metabolitos presentes en la muestra.
- Se necesitan “primer” específicos que sean complementarios al fragmento que se desea sintetizar.
- Puede contaminarse con otro DNA (puede ser del mismo investigador o de cualquier otra fuente).

2.1.4 RFLP (Fragmentos Largos Polimórficos de Restricción), análisis posterior a la PCR.

El RFLP es una técnica usada desde 1970. Los RFLPs se definen como la variación en la longitud de los fragmentos de DNA producida por una enzima de restricción específica a partir de DNAs genómicos de dos o más especies. Como se mencionó se necesitan las “enzimas de restricción”, éstas actúan como “tijeras moleculares” altamente específicas, reconocen y cortan el DNA en sitios específicos. La gran mayoría reconocen secuencias de cuatro, cinco ó seis nucleótidos de longitud. [9]

El RFLP de manera experimental es realizado a partir de la amplificación de un segmento de DNA específico, con una posterior digestión de éste, con una enzima de restricción concluyendo el análisis con una electroforesis en gel de agarosa. [3]

Las muestras obtenidas de ésta técnica son colocadas sobre un gel y sometidas a la acción de un campo eléctrico (electroforesis) migrando de una manera característica

que se puede visualizar por tinción (coloreado) del DNA con bromuro de etidio, tal como en la PCR. [16]

CAPÍTULO 3. LOS CLOROPLASTOS

3. Los Cloroplastos

Son unos orgánulos que se localizan en las células vegetales. La función principal del cloroplasto es realizar la fotosíntesis, la cual consiste en la conversión de la energía luminosa procedente del sol en energía eléctrica y después en energía química. Esta energía será utilizada para formar materia orgánica propia o biomasa (carbohidratos -sacarosa y almidón-) a partir de moléculas inorgánicas, como agua, CO₂ y sales minerales. El O₂ molecular, resultante de la ruptura de moléculas de agua que intervienen en el proceso, se desprende como producto de desecho. [6]

Además de la fotosíntesis, en ellos se llevan a cabo otros procesos metabólicos, como la síntesis de aminoácidos. [6] El 35% del cloroplasto está constituido por lípidos, 5% por proteínas y 7% por pigmentos, entre los cuales predomina la clorofila, que absorbe la luz y confiere el color verde. Este orgánulo mide de 3 a 10 µm de longitud y de 0,5 a 2 µm de grosor; circundado por una membrana doble separada entre sí, por un espacio intermembranal. Cada unidad de membrana tiene de 8 a 10 nm de ancho. El estroma se encuentra entre la membrana interna y la membrana de los tilacoides. Los tilacoides son invaginaciones de la membrana interna constituidos por dos membranas paralelas con un grosor de 7 nm cada una y el lumen del tilacoide varía de 4 a 7 nm de grosor (ver figura 7).

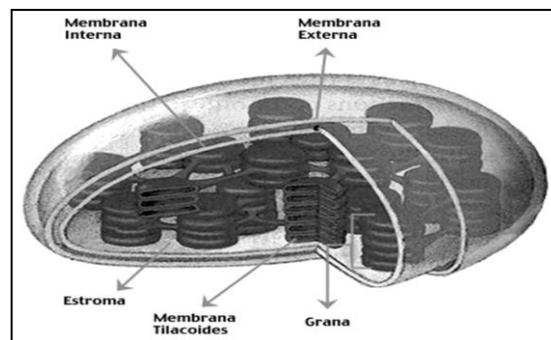


Figura 7. Estructura del cloroplasto. [61]

En los cloroplastos de las plantas superiores, los tilacoides se apilan formando una grana, o atraviesan el estroma interconectando los grana (tilacoides del estroma). Un granum tiene cerca de 10 a 100 tilacoides y cada cloroplasto contiene entre 40 y 60 grana. Los dos extremos de un granum están en estrecho contacto con el estroma y reciben el nombre de márgenes: el tilacoide marginal se denomina membrana granal terminal. De 20 a 50 copias del genoma del cloroplasto (cpADN) están localizadas en una región llamada nucleoide, mientras que los ribosomas se encuentran en el estroma o unidos a la superficie de las membranas del tilacoide (ver figura 7 y 8). [29]

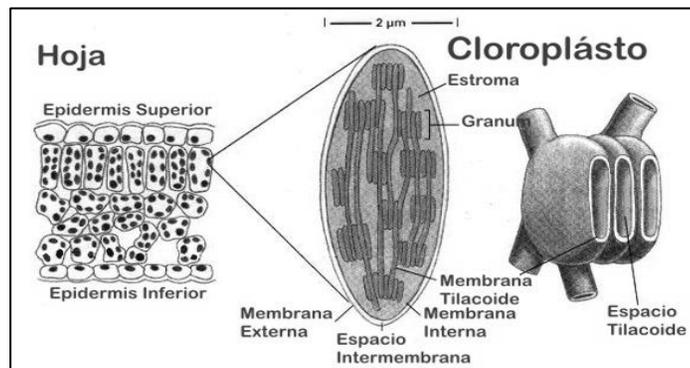


Figura 8. Vista tridimensional del cloroplasto. [62]

3.1 DNA de Cloroplasto (cpADN)

La evolución molecular de las plantas ha sido dominada por el estudio del genoma del cloroplasto (cpADN) habiendo varias razones. [15] En primer lugar, es un componente abundante del ADN celular total, lo que facilitó su caracterización molecular. En segunda, resultó tener una tasa de sustitución de nucleótidos conservadora, [21] y bajas tasas de evolución por lo que son ideales para el estudio de las relaciones filogenéticas. [14,51]

Adentrándose en el genoma cloroplástico de las plantas terrestres, podemos mencionar un conjunto constante de componentes para el funcionamiento de la maquinaria de la síntesis de proteínas, la cual es indispensable para la supervivencia de plantas y algas que dependen del CO₂ como su única fuente de carbono, ya que numerosas proteínas requeridas para la fotosíntesis son producto de los genes de estos plastidos. [29]

3.2 Organización del genoma de cloroplasto (cpADN) del café arábica

El cloroplasto en el caso del café arábica (*Coffea arábica*) contiene copias de una molécula circular de ADN de 155 189 pares de bases (pb) con una estructura cuatripartita típica de la mayoría de las plantas, cuenta con dos regiones de secuencia única, la (LSC) con una longitud de 85 166 pb y la menor (SSC) de 18 137 pb, separadas por dos copias de una repetición invertida (IRa y IRb), conteniendo genes que codifican los RNAr de cloroplasto en un 6%; ciertos genes RNAt, en un 2%; proteínas, en un 51%; intrones, en un 9% y secuencias intergenéticas, en un 32%. De los 130 genes presentes en el genoma 112 están presentes en una sola copia y 18 son duplicados en la región IR. La región de codificación incluye 79 genes para proteínas, 29 RNAt y 4 RNAr. La secuencia de codificación es del 59.35% de los cuales un 51.76% codifica para proteínas (ver figura 9). [53]

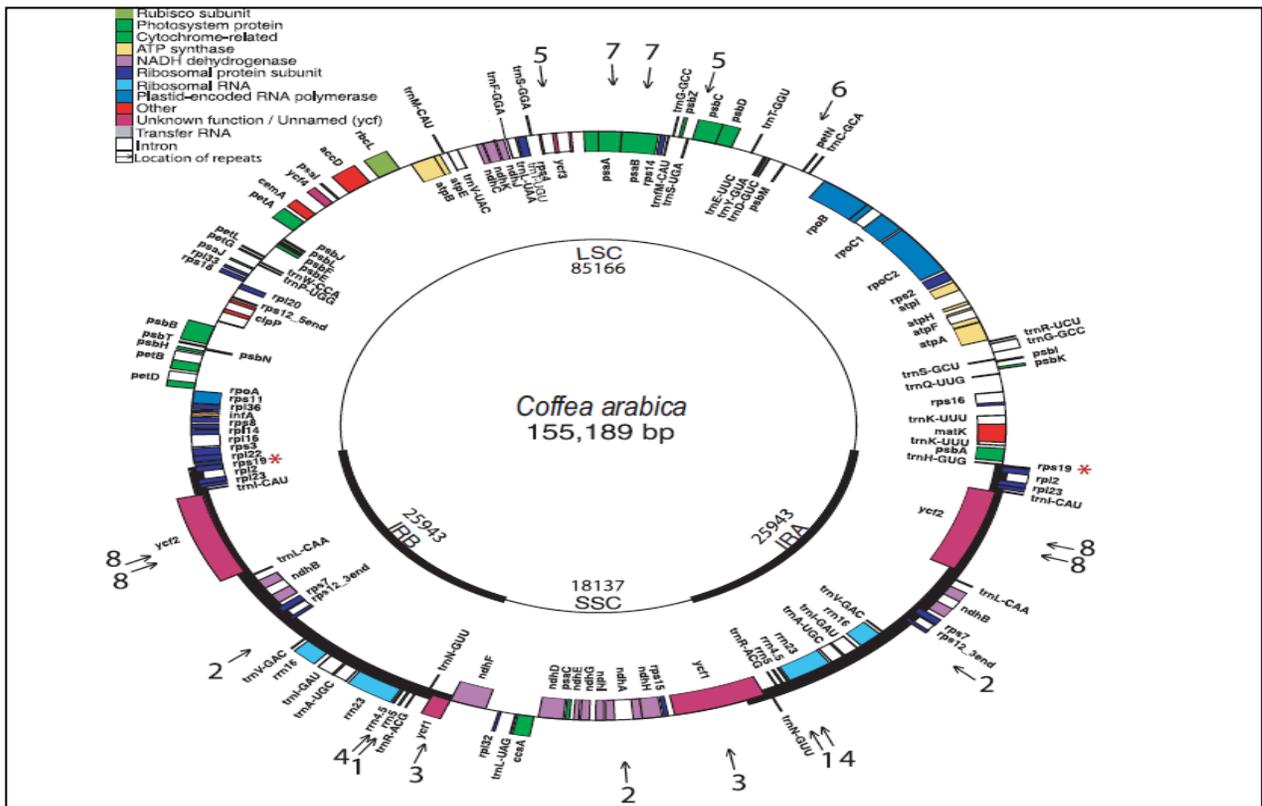
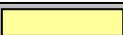
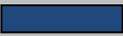
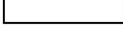


Tabla 7. Función de los genes de acuerdo al color en la figura 11. [53]

Color de acuerdo a la figura	Función de los genes
Verde Claro 	Involucrados en la producción de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa.
Verde Oscuro 	Proteínas involucradas en los procesos fotosintéticos así como los relacionados al citocromo.
Crema 	Involucrados en la producción de la enzima ATP sintasa.
Morado 	Involucrados en la producción de la enzima NADH deshidrogenasa.
Azul oscuro 	Subunidades de las proteínas ribosomales.
Azul claro 	Síntesis de ARN ribosomal.
Azul 	Plástidos involucrados en la síntesis de ARN polimerasa.
Rojo 	No se conoce totalmente su función.
Gris 	Síntesis de ARN de transferencia.
Blanco 	Zona con intrones.

Las proteínas sintetizadas por los genes del cpDNA del café Arábica (*Coffea Arábica*) son mostradas en el **ANEXO** (ver tabla 18, página 73).

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 Cuadro metodológico (Figura 10)

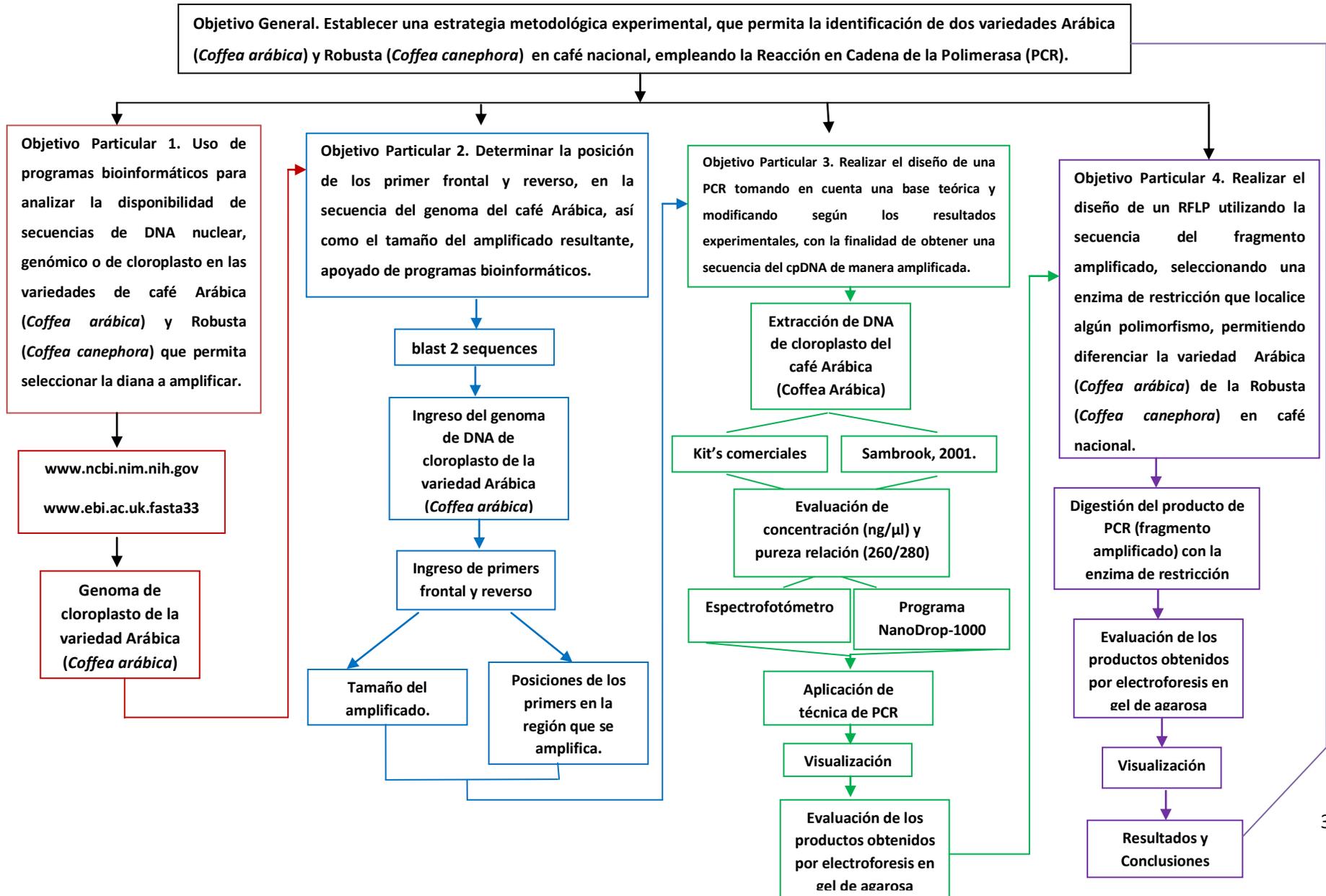


Figura 10. Cuadro metodológico.

4.1.1 Descripción del cuadro metodológico

La metodología planteada en esta experimentación se basa en 4 objetivos particulares y una actividad preliminar, los cuales nos llevarán a la conclusión de este proyecto de investigación, consiguiendo la identificación del café Arábica (*Coffea arabica*) y el Robusta (*Coffea canephora*) en café nacional haciendo uso de la PCR.

4.1.1.1 Actividades preliminares

Realizar una investigación bibliográfica exhaustiva acerca del café, desde generalidades hasta tomar en cuenta las características de cada variedad, propiedades, cultivo, producción, consumo, tecnología de su procesado, cambios tras el mismo, situaciones actuales, y lo más importante metodologías utilizadas para su autenticación, una de ellas la espectroscopía infrarroja y como una alternativa la PCR vista en artículos que hacen referencia al café.

4.1.1.2 Objetivos

Objetivo general

Establecer una estrategia metodológica experimental, que permita la identificación de dos variedades Arábica (*Coffea arabica*) y Robusta (*Coffea canephora*) en café nacional, empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Objetivo particular 1

Uso de programas bioinformáticos para analizar la disponibilidad de secuencias de DNA nuclear, genómico o de cloroplasto en las variedades de café Arábica (*Coffea arabica*) y Robusta (*Coffea canephora*) que permita seleccionar la diana a amplificar.

Objetivo particular 2

Determinar la posición de los primer frontal y reverso, en la secuencia del genoma del café Arábica (*Coffea arabica*), así como el tamaño del amplificado resultante, apoyado de programas bioinformáticos.

Objetivo particular 3

Realizar el diseño de una PCR teniendo una base teórica y modificando según los resultados experimentales con la finalidad de obtener una secuencia del cpDNA de manera amplificada.

Objetivo particular 4

Realizar el diseño de un RFLP utilizando la secuencia del fragmento amplificado, seleccionando una enzima de restricción que localice algún polimorfismo, permitiendo diferenciar la variedad Arábica (*Coffea arábica*) de la Robusta (*Coffea canephora*) en café nacional.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Material biológico

Se trabajó con 13 muestras de café verde (ver tabla 8) pertenecientes a dos distintas compañías una de ellas Agroindustrias unidas de México SA de CV y la otra Café Mahuer, la variedad a la que pertenecen; así como el estado de la república mexicana de origen son mencionados a continuación.

Tabla 8. Muestras de café verde utilizadas para la experimentación

Número de muestra	Variedad	Estado de origen	Empresa
1	Robusta	Hidalgo	Mahuer
2	Arábica	Chiapas	Mahuer
3	Robusta	Veracruz	Mahuer
4	Robusta	Puebla	Mahuer
5	Arábica	Oaxaca	Mahuer
6	Arábica	Guerrero	Mahuer
7	Arábica	Veracruz	Mahuer

8	Arábica	Oaxaca	Mahuer
9	Arábica	Veracruz	Agroindustrias. U. M.
10	Arábica	Chiapas	Agroindustrias. U. M.
11	Arábica	Chiapas	Agroindustrias. U. M.
12	Robusta	Veracruz	Agroindustrias. U. M.
13	Arábica	Veracruz	Agroindustrias. U. M.

Con respecto a las muestras de café molido y en grano tostado (ver tabla 9), fueron obtenidas en distintas casas y centros comerciales dedicados a la venta exclusiva de café en algunos casos y en otros; en aquellas que ofrecen todo tipo de artículos, mencionándose en la siguiente tabla, sin embargo; la variedad al igual del estado de origen en distintas muestras se mencionan como desconocidas, esto por la falta de información tanto en las etiquetas, como por el desconocimiento de los empleados al ofrecer los productos a la venta.

Tabla 9. Muestras de café en grano tostado y procesado utilizado para la experimentación

Número de muestra	Variedad	Estado de origen
14	Arábica	Puebla
15	Desconocida	Veracruz
16	Desconocida	Veracruz
17	Desconocida	Veracruz
18	Robusta	Veracruz, Oaxaca, entre otros.
19	Robusta	Veracruz, Oaxaca, entre otros.
20	Desconocida	Desconocido

21	Desconocida	Desconocido
22	Desconocida	Desconocido
23	Desconocida	Desconocido
24	Arábica	Veracruz
25	Desconocida	Desconocido
26	Desconocida	Desconocido
27	Desconocida	Desconocido
28	Desconocida	Desconocido

4.2.2 Reactivos, Materiales y Equipo utilizado

REACTIVOS

- Kit de soluciones ZR Plant/Seed DNA TM, Zymo Research de Fermentas. El cual contiene solución de lisis, Plant/Seed DNA Bindind Buffer, DNA Pre-Wash Buffer, Plant/Seed DNA Wash Buffer, DNA Elution Buffer
- Kit de soluciones PureLink TM Plant total DNA de Invitrogen. El cual contiene Resuspension Buffer, Precipitation Buffer, Bindind Buffer, Wash Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, RNase a (20mg/ml RNase a 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM EDTA)
- Kit de soluciones Phire^R Plant Direct PCR de FINNZYMES. El cual contiene 2x Phire^R Plant PCR Buffer y Phire^R Hot Start DNA Polymerase
- Solución de lisis: Tris-HCl₂ 50Mm, EDTA 50 mM pH=8.0 y NaCl 250 mM
- Enzima Proteinasa K
- Mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico 12:24:1
- Etanol puro
- Solución Master Mix de promega, PCR Master Mix^R: Taq polimerasa 50 U/ml, dNTPs 400 mM y MgCl₂ 3 Mm.
- Enzima de restricción Psu I de Fermentas
- Agarosa ultrapura invitrogen
- Buffer invitrogen TAE 10X (Tris acetate 400 Mm, EDTA 10 mM)
- Bromuro de etidio CLP^R 0.5 µg/ml

- Buffer de carga invitrogen azul/naranja 6X (azul de bromofenol 0.03%, xileno 0.03%, naranja G 0.4%, Ficoll^R 15% Tris-HCl 10 Mm (pH=8)
- Marcador de peso molecular Promega 1 kb 100 µg/ml (Tris-HCl (pH=7.4), EDTA 1mM)
- Oligos invitrogen a una concentración de 25 mM

MATERIALES

- Tubos eppendorf 1, 1.5 y 2 ml
- Puntas para pipeta de distintos tamaños
- Papel parafilm
- Piceta
- Gradilla refrigerada
- Guantes

EQUIPOS

- Termociclador Apollo ATC401 CLP
- Fotodocumentador Claver Scientific LTD
- Fuente de poder Power Pac 1000
- Cámara de electroforesis Apollo by CE para 10 pozos
- Termomixer compac eppendorf
- Microcentrífuga minispin plus eppendorf 1400 rpm
- Vortex *Genie K-55-G*
- Nanodrop ND-1000 A113 Accesolab
- Báscula Cole Parmer PR410 Equipar de 500 mg
- Pipetas eppendorf de 2, 10, 100, 200 y 1000 µl

4.3 Métodos

4.3.1 Extracción de DNA total a partir de tejido vegetal

Para la extracción del DNA en los diferentes tipos de café (en grano verde, tostado, y procesado molido) de las dos variedades (arábica y robusta), se evaluaron distintos protocolos, haciendo ciertas modificaciones a metodologías publicadas [36,54] y, a técnicas ya existentes como la de Sambrook, J 2001; que se basa en la desintegración del tejido de café con proteinasas y detergentes para la liberación del contenido celular, la extracción de polisacáridos y proteínas distintas al DNA con una

mezcla de fenol cloroformo alcohol isoamílico, finalizando con la precipitación de éste al usar etanol. Y de manera posterior se hizo uso de kits comerciales de distintas compañías mencionando ser específicos para tejidos vegetales, entre ellos; GE Healthcare, Charge Switch, Pure Link, ZR Plant/Seed DNA, Finnzymes.

4.3.1.1 Método siguiendo la técnica de Sambrook, 2001

Se trituró una cantidad considerable de granos de café de cada variedad. A partir de ahí se tomaron 100 mg de muestra apoyados de una balanza analítica electrónica marca *Cole parmer PR410 Equipar de 500mg*, se hizo uso de nitrógeno líquido o PVPP para continuar con la maceración en un mortero, agregando 300 µl de solución de lisis (*Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%*) y perlas de vidrio para cada tubo eppendorf, así como 14 µl de proteinasa K, después la muestra se agitó ligeramente con ayuda del vortex *Genie K-55-G* esto para la liberación del contenido celular. Se incubó en un calentador para tubos eppendorf marca *termomixer* a 50°C por un tiempo de 60 minutos, y posteriormente se inactivó la enzima a una temperatura de 60°C por 60 minutos como mínimo. Se adicionó una mezcla de fenol, cloroformo-alcohol isoamílico en cantidad de 500 µl para cada tubo. Se mezcló suavemente de manera manual por 10 minutos y se centrifugó a 10 000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos en una microcentrífuga marca *minispin plus eppendorf de 14000 rpm*. Existió una separación de fases, recuperándose la fase acuosa superior que contiene el DNA, evitando cualquiera de las otras fases formadas. Se trasladó la fase recuperada a dos tubos nuevos. Se adicionó 1 ml de etanol frío a cada uno de los tubos (apreciándose turbidez), lo que hace referencia a la presencia del DNA. Se mezcló suavemente. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente en una microcentrífuga marca *minispin plus eppendorf de 14000 rpm*. Se decantó el etanol de cada tubo y se dejó secar la pastilla de DNA formada en el calentador para tubos eppendorf marca *termomixer* a 31°C. Una vez que ya no se detectó el olor a etanol se procedió a la resuspensión de la pastilla de DNA con 100 µl de agua libre de nucleasas (ver tabla 10).

Tabla 10. Algunos de los resultados obtenidos con la técnica de Sambrook, 2001.

Muestra	Concentración (ng/μl)	Relación (260/280)
A	459.83	1.69
B	390.64	1.28

Con éstos resultados se procedió a la técnica de PCR.

4.3.2 Cuantificación del DNA por medio de la absorbancia relación (260/280)

La relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm se utiliza para evaluar la pureza del ADN y el ARN. Un resultado de la relación (260/280) de ~ 1.8 es generalmente aceptado como "puro" para el DNA, si el valor de la proporción es menor, puede indicar la presencia de proteínas distintas, fenol u otros contaminantes que absorben la luz cerca de los 280 nm. [51] La concentración de DNA así como la relación (260/280) fueron medidas con la ayuda del espectrofotómetro marca *Abccesolab* apoyado del programa NanoDrop *ND-1000*.

- Método para la medición de la concentración de DNA (ng/μl) y la relación de absorbancia (260/280)

Se calibró el espectrofotómetro marca *Accesolab* colocando 2μl de agua libre de nucleasas en el brazo del equipo. Se abrió el programa NanoDrop ND-1000 y se seleccionó la opción de ácidos nucleicos. Se colocaron nuevamente 2 μl de agua libre de nucleasas para registrarlo como blanco, corriéndose el programa. Se colocaron 2 μl de la muestra de ADN a cuantificar y se corrió el programa. La concentración de DNA y la relación 260/280 son registradas por el equipo y posteriormente este se limpia adecuadamente.

4.3.3 Amplificación de DNA por PCR.

4.3.3.1 Preparación de la reacción para PCR.

- Método según el kit para PCR de Promega

Los primers seleccionados para este proyecto fueron tomados de *Spaniolas, 2006*. La secuencia del primer frontal es (5' a 3') AATCGATCTGGACGGAAAAGC; y la del primer reverso es (5' a 3') AGCATCCTCATTTTATGAGAAAAGG, [54] teniendo una concentración de 25 μM , mientras que el DNA una concentración recomendada de (40-50 ng/ μl). La preparación de las muestras se hizo de acuerdo al protocolo desarrollado por *Promega*. La mezcla fue preparada en tubos eppendorf de 1.5 ml (ver tabla 11).

Tabla 11. Componentes de la reacción según Promega en el kit de PCR

Componente	Volumen
Mezcla master mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400 μM de cada dNTP y 3mM de MgCl_2)	12.5 μl
Primer Frontal 25 μM	0.5 μl
Primer Reverso 25 μM	0.5 μl
Agua libre de nucleasas	10.5 μl
DNA	1.0 μl
Volumen final	25 μl

4.3.3.2 Programa de PCR

La programación del termociclador se realizó de acuerdo a la revisión bibliográfica y fue modificada según los resultados obtenidos (ver figura 11). La temperatura de desnaturalización inicial fue de 95°C por 4 minutos, mientras que las condiciones durante 40 ciclos fueron las siguientes; una temperatura de “desnaturalización” de 94°C durante 45 segundos, una etapa de “hibridación” a 58°C por 45 segundos, y una etapa de “extensión o elongación” a 72°C por 2 minutos, y una extensión final a 72°C por 10 minutos. [44, 55]

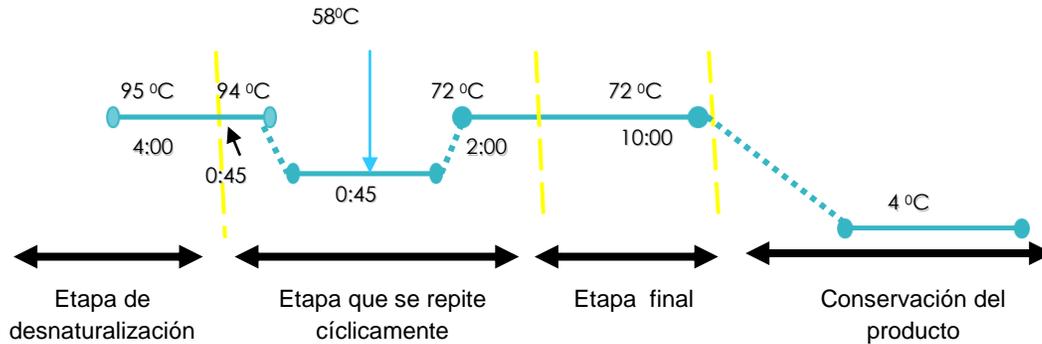


Figura 11. Etapas y condiciones programadas en el termociclador para Arábica (*Coffea arábica*) y Robusta (*Coffea canephora*).

4.3.4 Análisis de los productos

4.3.4.1 Preparación del gel de agarosa y electroforesis horizontal

El principio de la electroforesis consiste en la separación de macromoléculas, especialmente proteínas y ácidos nucleicos, que difieren en carga. Cuando estas moléculas son expuestas a un campo eléctrico migran. En éste caso el DNA está cargado negativamente, por lo tanto se dirige al ánodo (+); a través de un gel. [60]

- Método para la preparación del gel de agarosa al 3%

Se pesó la cantidad necesaria de agarosa 1.5 g de acuerdo al porcentaje del gel (3%). Se midió una cantidad de 50 ml de TAE 1X en una probeta de 100 ml; ambos (agarosa y TAE 1X) son depositados en un matraz erlenmeyer de 125 ml. La mezcla se calentó en el microondas, hasta disolver, y se añadió una gota de bromuro de etidio, mezclándose y vertiéndose de manera posterior en un cassette propio de la cámara de electroforesis marca *Apollo 75.710*, colocándole un peine el cual formó los pocillos al gelificar, evitándose corrientes de aire y desniveles, una vez formado el gel se coloca el cassette dentro de la cámara de electroforesis marca *Apollo 75.710*, llenándola con TAE 1X de modo que el gel quede cubierto.

La técnica se llevó a cabo, a una corriente de 90 volts; con una fuente de poder marca *Bio-Rad PowerPac 200*, y los pocillos del gel fueron cargados de acuerdo a las siguientes especificaciones para cada muestra (ver tabla 12).

Tabla 12. Muestra biológica y reactivos necesarios para la carga del gel de agarosa.

Componente	Volumen
Bromuro de Etidio	3 μ l
Colorante Blue/Orange 6X Loading Dye	3 μ l
Muestra o marcador de peso molecular	5 μ l

- Método para la carga del gel al 3% y la electroforesis
 1. Se toma un trozo de parafilm, en él se depositan las gotas de bromuro de etidio, colorante y muestra o marcador de peso molecular necesarias, cuidando que no se mezclen entre ellas (ver tabla 12).
 2. Se realiza la mezcla una a una de bromuro de etidio, más colorante, más muestra o marcador, y se depositan en el pocillo del gel correspondiente.
 3. Cuando se termina de cargar el gel se hace necesario el cierre de la cámara de electroforesis. Se conecta a la fuente de poder marca *Bio-Rad PowerPac 200* a un voltaje de 90 volts. El DNA tiene carga negativa por lo que este se moverá hacia el lado positivo.
 4. La corriente se mantiene hasta que el colorante se vea hasta el extremo contrario al cual empezó.

La visualización de los resultados de los geles de electroforesis se llevo a cabo en un foto documentador marca Claver Scientific LTD, la captura de estas imágenes visualizadas se logró utilizando un equipo de fotografía marca *Kodak Digital Science*.

Al no obtener resultados con la técnica de Sambrook, 2001 a pesar de las modificaciones se planteó el uso de kits comerciales, entre ellos; Healthcare (GE), Charge Switch (CS) y Pure Link (PR), sin embargo tampoco se obtuvieron los amplificados, los resultados de la extracción de DNA con estos protocolos se muestran en la tabla 14, en la sección de resultados.

Después de varios intentos se consideró solo el uso de los embriones de café de ambas variedades, ya que el grano a pesar de ser pulverizado con ayuda de nitrógeno líquido y al adicionársele PVPP para evitar la aparición de pigmentos^[30] o perlas de vidrio para romper el tejido y liberar el contenido celular, entre otros; no arrojó resultados positivos pues los polisacáridos que constituyen el grano entero de café así como los aceites presentes, actúan como inhibidores de la PCR.^[59] Se tomaron aproximadamente 50 granos a los cuales se les retiró el embrión, esto para cada muestra a trabajar. De manera posterior se les adicionó 300 µl de solución de lisis y 14 µl de proteinasa K. Se eliminó la parte del uso de nitrógeno líquido, debido a que el tejido trabajado era más blando, lo demás se consideró del mismo modo según la técnica de Sambrook, 2001.

Sin embargo tampoco se obtuvo el amplificado, por lo que se planteó el uso de un kit más, el ZR Plant/Seed de Zymo Research de la empresa Fermentas, debido a que mencionó ser específico para plantas y semillas, aunque por las experiencias anteriores para la extracción de DNA, se ocuparon solo los embriones de cada variedad de café a trabajar.

4.3.1.2 Método para la extracción de DNA utilizando el kit ZR Plant/Seed de Zymo Research de la empresa Fermentas

Se pesaron 150 mg de la muestra (embriones correspondientes al peso) en una balanza analítica electrónica marca *Cole parmer PR410 Equipar de 500mg*, adicionando 750 µl de solución de lisis. Se agitó en el vortex marca *Genie K-55-G* por 10 minutos a máxima velocidad, evitando el calentamiento de la muestra. Se centrifugó el tubo con la muestra y la solución de lisis en una microcentrífuga marca *minispin plus eppendorf de 14000 rpm* a 10 000 rpm por 1 minuto, agitado ya en el vortex *Genie K-55-G*. Se transfirió 400 µl de la muestra del paso anterior, a otro tubo, centrifugando a 7 000 rpm por 1 minuto. Se adicionaron 1 200 µl de una solución llamada *Binding Buffer* al filtrado obtenido del paso anterior y se mezcló. Se transfirieron 800 µl de la muestra del paso anterior a un tubo nuevo y se centrifugó a 10 000 por 1 minuto. Se desechó el flujo de paso y se repitió el paso anterior. Se adicionaron 200 µl de *DNA Pre Wash Buffer* a una columna incorporada en un tubo,

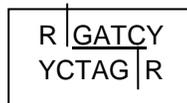
y se centrifugó a 10 000 por 1 minuto. Se adicionaron 500 µl de *Plant/Seed DNA Wash Buffer* a la columna que contiene la muestra y se centrifugó a 10 000 rpm por 1 minuto. Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, y se adicionaron 75 µl de *DNA Elution Buffer* directamente en la columna matriz, se centrifugó a 10 000 rpm por 30 segundos para eluir el DNA. Se transfirió el DNA eluído del paso anterior a un tubo, poniéndole como base un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó a exactamente 8 000 rpm por 1 minuto, el filtrado obtenido es el DNA listo para ser usado en la PCR.

Después de la extracción del DNA con el kit se procede a la medición de la concentración y de la relación de absorbancia (260/280) (ver tabla 14); así como a la preparación de la reacción para la técnica de PCR según lo mencionado por Promega (ver tabla 10) y su posterior corrida electroforética en un gel de agarosa al 3%.

Se obtuvieron los amplificados de 251 pb; lo que nos llevó al uso de este kit para el grano verde de café de ambas variedades (Arábica y Robusta) y el posterior RFLP.

4.3.5 Diseño de RFLP

El RFLP se realizó al digerir el producto de PCR con la enzima *Psul*, la cual es una enzima de restricción [10] que reconoce la siguiente secuencia, donde “R” representa una adenina o guanina y “Y” una citosina o timina.



La *Psul* ubica un sitio de restricción presente en Robusta, dando dos fragmentos uno de 92 y otro de 159 pb, mientras que en Arábica está ausente con una diana intacta de 251 pb. Para la digestión se utilizó el producto de PCR que amplificó en una cantidad de 8 µl, más 1 µl de la enzima de restricción *Psul* y 1 µl del Buffer B; ambos de la empresa Fermentas. Se mezclaron y se incubaron a una temperatura de 37 °C en un tiempo de 60 minutos como mínimo en un calentador para tubos eppendorf marca *termomixer*, lo cual es constatado con los resultados mostrados. Al hacer uso de este kit (ZR Plant/Seed de Zymo Research de la empresa Fermentas),

en muestras de café en grano tostado y en el ya procesado se lograron obtener amplificadas muy tenues, los cuales no servirían para hacer la posterior digestión pues las bandas no serían nada notables, por lo que se buscaron alternativas tratando de estandarizar aún más la técnica, así como el uso de otro kit el Phire Plant Direct PCR, de la empresa Finnzymes, ofreciendo hacer una PCR directa; sin necesidad de extraer el DNA, el cual por el procesamiento ya pudiera estar fragmentado debido a las temperaturas a las cuales es sometido. Así como de evitar el paso de medir la concentración y la relación (260/280).

4.3.1.3 Método utilizando el kit Phire Plant Direct PCR, de la empresa Finnzymes

Se preparó la reacción de acuerdo a las especificaciones sugeridas en la guía del kit (ver tabla 13).

Tabla 13. Componentes para la reacción de PCR directa, según kit Phire Plant Direct PCR, de la empresa Finnzymes.

Componente	Para 20 µl de reacción
Agua libre de nucleasas	8.6 µl
2x Phire Plant PCR Buffer	10 µl
Primer	0.5 µl
Phire Hot Start DNA Polymerase	0.4 µl
Tejido de la planta	.5 µg

Con éste kit se lograron obtener amplificadas visibles para algunas muestras de café tostado en grano (0.5 µg), utilizando solamente 1 embrión por muestra para estandarizar la técnica. Los amplificadas posteriores a la PCR fueron digeridos con la enzima PstI con las condiciones anteriormente mencionadas.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Selección de los primers

Los primers seleccionados para este proyecto fueron tomados de *Spaniolas., 2006* (ver **ANEXO** figura 23). Estos se revisaron con el programa bioinformático blast2 sequence y el genoma de cloroplasto del café Arábica (*Coffea arábica*), con el propósito de confirmar la posición y el tamaño del amplificado (ver **ANEXO** figura 24, 25 y 26). El primer frontal se ubica de la posición 48308 a la 48328, mientras que el reverso de la 48534 a la 48558. El tamaño del amplificado (ver **ANEXO** página 74) resulta en una diana de 251 pares de bases, con una afinidad del 100 por ciento, lo cual indica que son específicos para la zona de interés de la variedad en cuestión confirmando lo pretendido por *Spaniolas., 2006*.

Secuencia del primer frontal (5' a 3') AATCGATCTGGACGGAAAAGC

Secuencia del primer reverso (5' a 3') AGCATCCTCATTTTATGAGAAAAGG

Tomando en cuenta lo anterior se prosigue con la experimentación.

Se decidió trabajar con este espacio intergenético -secuencia trnL/trnF del cloroplasto- (ver figura 12), debido a su uso en el estudio filogenético de plantas, [19] en la identificación de especies, así como por la estabilidad de la transmisión de información genética de ésta región debido a su herencia materna; [43, 53, 55] al igual de representar un papel importante en la autenticación de alimentos y posibles adulteraciones, si su uso es combinado con enzimas de restricción. [44,55] El genoma fue ubicado con el GI (número de localización) 116242143, en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ver **ANEXO** figura 26).

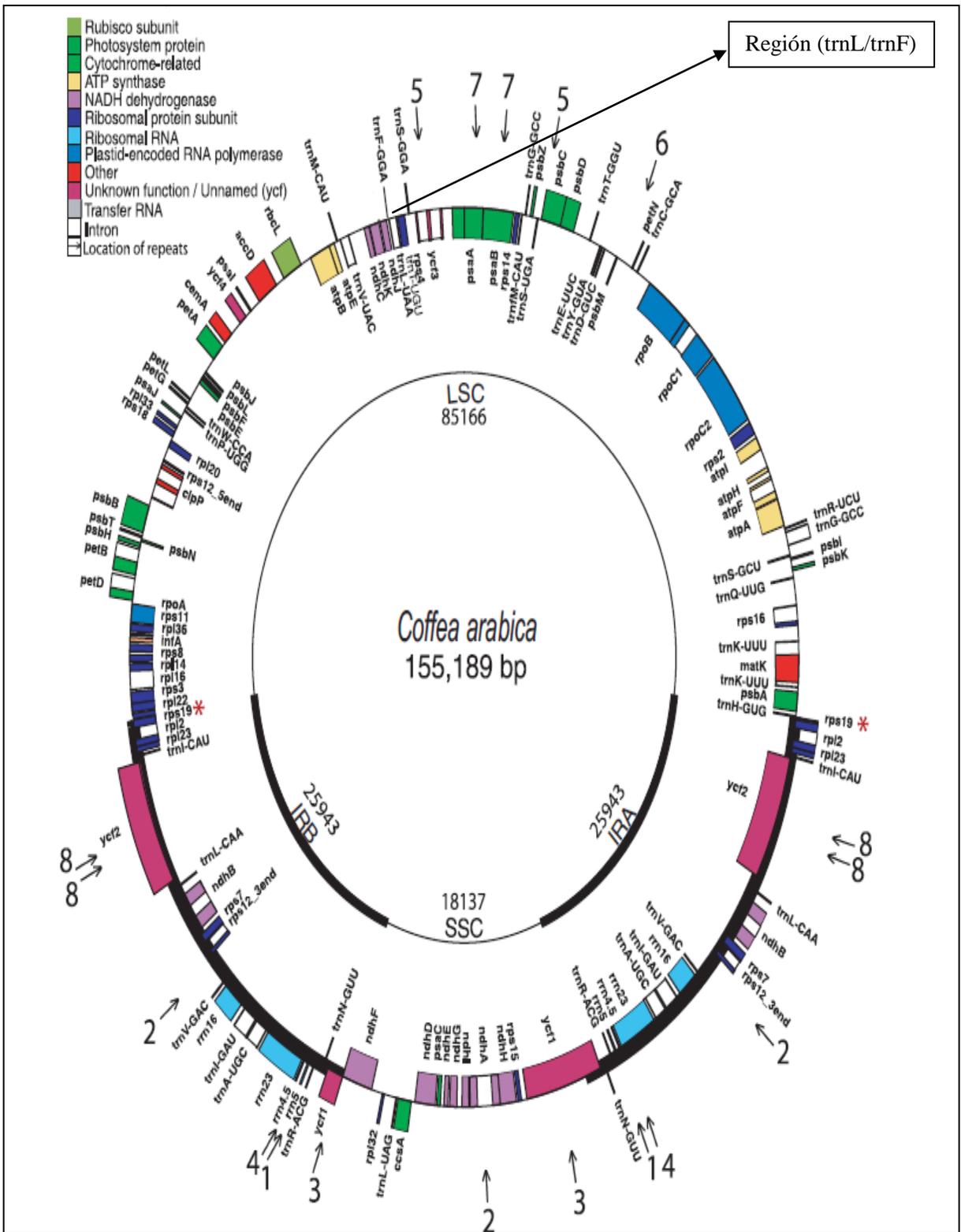


Figura 12. Genoma completo de Cloroplasto del café Arábica (*Coffea Arábica*). [52]

5.1.1 Evaluación experimental de la especificidad de los primer.

Se verificó que los primer fueran específicos y no hibridaban con alguna otra especie (ver figura 13).

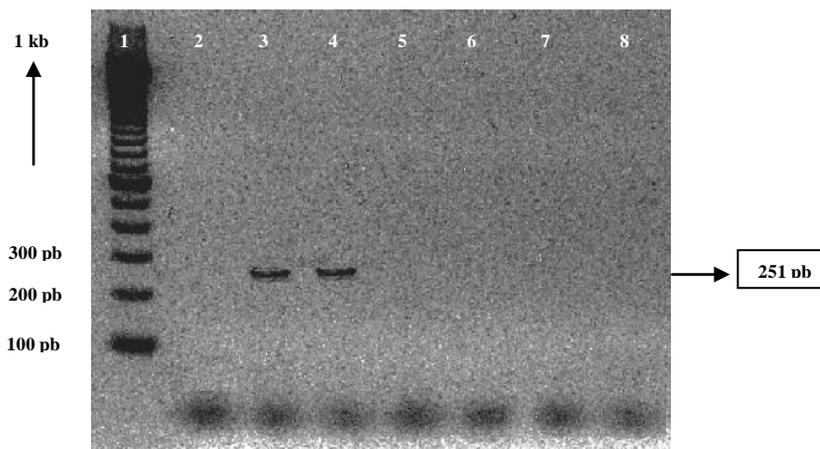


Figura 13. Fotografía de un gel de agarosa al 3% que expone muestras filogenéticamente parecidas (1 a 7) y lejanas en el caso de la leche (8). En el carril (1) se muestra el marcador de peso molecular, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) la variedad Arábica, en el carril (4) a la variedad Robusta, en el carril (5) al maíz, en el carril (6) al trigo, en el carril (7) a la soya y en el carril (8) a la leche.

Podemos constatar que los primer sí son específicos, debido a que no existe la amplificación con ninguna de las otras especies, por más cercanas o lejanas que estas parecen en el sentido filogenético. Se muestra una banda de 251pb., en el caso de la variedad Arábica (*Coffea arabica*); así como en la variedad Robusta (*Coffea canephora*); por lo tanto los datos arrojados por el programa bioinformático blast 2 sequence, fueron correctos.

5.2 Evaluación experimental de las técnicas de extracción de DNA

En el apartado 4.3.1 del capítulo 4, se hace referencia a distintas técnicas de extracción de DNA (Sambrook, 2001; kit ZR Plant/Seed de Zymo Research y kit Phire Plant Direct PCR de Finnzymes). En un inicio se comenzó tratando de estandarizar el protocolo descrito por Sambrook, 2001, sin embargo no se obtuvieron los amplificadores esperados (ver tabla 14 para consultar resultados); se consideró su mención porque hasta el momento ha sido una de las metodologías planteadas con

éxito en proyectos ya realizados, ampliamente utilizada para la posterior amplificación de fragmentos por PCR. Una teoría de lo que posiblemente sucedió, es que durante la homogenización de la muestra se liberan metabolitos secundarios presentes en vacuolas como complejos fenólicos que sirven de sustrato a la polifenoloxidasa (PPO), lo cual provoca la formación de coloraciones; además de que también son liberados pigmentos como la clorofila, los cuales alteran el valor de la relación de absorbancia (260/280) [30], la cual nos indica la pureza del DNA, además de que se hacía uso total del grano de café (previamente fragmentado a un polvo fino), lo que incluyó aceites, polisacáridos y proteínas distintas al DNA que tal vez no eran eliminadas durante la extracción.

Después de no lograr la amplificación de las bandas deseadas con ésta técnica y sus modificaciones, se planteó el uso de un kit comercial, como se mencionó fueron probados algunos específicos para plantas de distintas empresas (Healthcare, Charge Switch, Pure Link de Invitrogen). En el caso de la demostración de éstos por parte de personal capacitado, se llegó a la conclusión de que ninguno era realmente efectivo. En algunos casos se planteaba el uso de “n” número de lavados al DNA para eliminar pigmentos o contaminantes asociados a él, que al final ya no existía su presencia y en otros, se obtenía DNA aún con pigmentos.

Tabla 14. Resultados de la extracción de DNA con distintas metodologías

Kit o técnica utilizada	Muestra	Concentración (ng/μl)	Absorbancia (260/280)
Healthcare. Illustra	A (Arábica)	182.86	1.15
	B (Robusta)	480.84	1.18
Charge Switch. Invitrogen	A (Arábica)	-31.66	4.45
	B (Robusta)	- 9.62	-1.46
Pure Link Plant total. Invitrogen	A (Arábica)	3.78	1.15
	B (Robusta)	1.20	1.00

Sambrook, 2001	A (Arábica)	296.35	1.36
	B (Robusta)	206.83	1.44

Después de estos resultados nada alentadores, se probó un kit más, el ZR Plant/Seed DNA Zymo Research de la empresa Fermentas, el cual mencionó que era para plantas y semillas; aunque tomando en cuenta lo anterior, se decidió hacer uso igualmente solo de los embriones de café, con la finalidad de trabajar con una muestra libre de gran cantidad de polisacáridos y grasas. Para cada muestra se consideraban granos a los cuales se les retiraba el embrión correspondiendo a una cantidad de 150 mg, y se seguía el protocolo mencionado de acuerdo al kit. Lo cual arrojó resultados positivos a pesar de que la concentración de DNA no era demasiada, ni tampoco se tenía una relación de absorbancia (260/280) cercana a 1.8 (ver tabla 15). Se observó que el DNA extraído ya no presentaba pigmentos y los lavados planteados en el kit no favorecieron su eliminación.

Tabla 15. Valores de concentración y absorbancia relación (260/280) de las muestras Arábica y Robusta.

Número de muestra	Concentración (ng/μl)	Absorbancia (260/280)
1 Robusta	50.97	1.04
2 Arábica	78.18	1.09
3 Arábica	51.70	1.62
4 Robusta	44.5	1.23
5 Arábica	55.44	1.22
6 Arábica	49.77	1.09
7 Arábica	54.34	0.96

5.3 Evaluación experimental de la técnica de PCR

Se probaron las condiciones de trabajo empleadas en un artículo publicado *Spaniolas., 2006*; ^{1 kb} nbargo no hubo amplificación del fragmento, por lo que se decidió hacer una revisión exhaustiva, comparándolas con las utilizadas en otros artículos haciendo referencia al café, hasta llegar con el publicado por *Mishra., 2008*, esto no quiere decir que no se realizaron cambios de manera propia (cálculos de “Tm”, en base a la ecuación de Wallace y a programas bioinformáticos), sino que se necesitaba la comparación, para determinar cuál era el problema de la ineficacia en la PCR; de acuerdo a esto se pudo establecer que el error fue ubicado estrictamente en la temperatura de hibridación del primer “Tm”, puesto que las demás temperaturas y tiempos eran muy parecidos en ambos. En el artículo citado por *Mishra., 2008*, se plantea que ésta condición depende del tamaño del primer, no obstante la máxima temperatura utilizada con éxito se demostró que es a los 58°C, por lo tanto las condiciones de PCR para la obtención del amplificado de 251 pb., de las variedades de café fueron las siguientes; [44] una temperatura de inicio de 95°C por 4 minutos, y 40 ciclos bajo las siguientes condiciones de trabajo; una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 45 segundos, una temperatura de alineación o hibridación de 58°C por 45 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 2 minutos; mientras que la extensión final se llevó a cabo a 72°C por 10 minutos. Obteniéndose los siguientes resultados.



Figura 14. Fotografía de un gel de agarosa al 3% que muestra los amplificados resultantes de la PCR en grano verde de café de la variedad Arábica y Robusta. En el carril (1) se tiene el marcador de peso molecular, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) se muestra la variedad Arábica, en el

carril (4) a la variedad Robusta, en el carril (7) a la variedad Arábica y en el carril (8) a la variedad Robusta.

Observando la figura, se podría pensar a primera instancia que se trata de distintas muestras, sin embargo no es así, la 3 y la 7 corresponden a la misma Arábica, al igual que la 4 y la 8 a la misma Robusta. Lo que se realizó fue estandarizar la técnica en cuanto a la concentración de DNA adecuado para un amplificado intenso y el posterior RFLP, por lo que en el número 3 y 4 se trabaja a la concentración original de DNA obtenido con el kit, mientras que en la 7 y la 8 se ajustó la concentración estrictamente a 40 ng/μl recomendado en algunos casos. [2,55] Los resultados revelaron una banda de 251 pb., más intensa trabajando con la concentración original que ya ajustado. Por lo que se prosiguió a realizar el RFLP con la enzima *Psu I*, una enzima de restricción [10] la cual cortará la diana en una región específica - trn L y trn F- (ver figura 12); obteniendo los resultados mostrados en la figura 15.

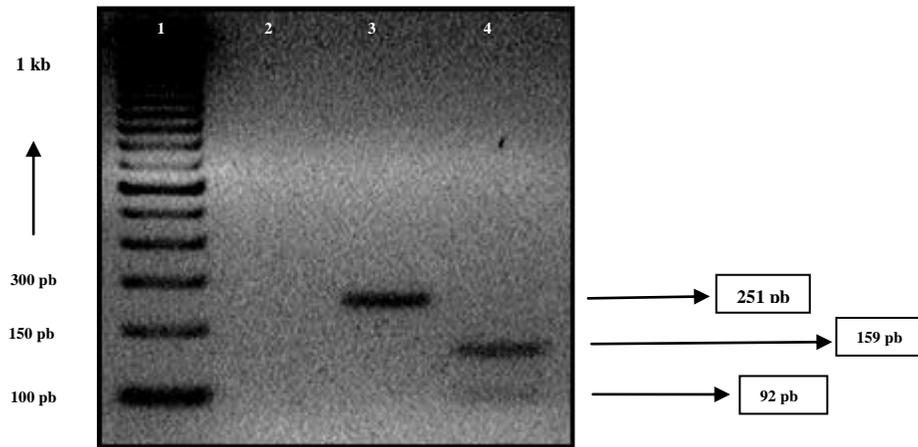


Figura 15. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los fragmentos resultantes del RFLP después de la digestión con la enzima *Psu I*, en grano verde de café de la variedad Arábica y Robusta. En el carril (1) se muestra el marcador, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) se muestra a la variedad Arábica y en el carril (4) a la variedad Robusta.

Estandarizada la técnica se incluyen todas las muestras.

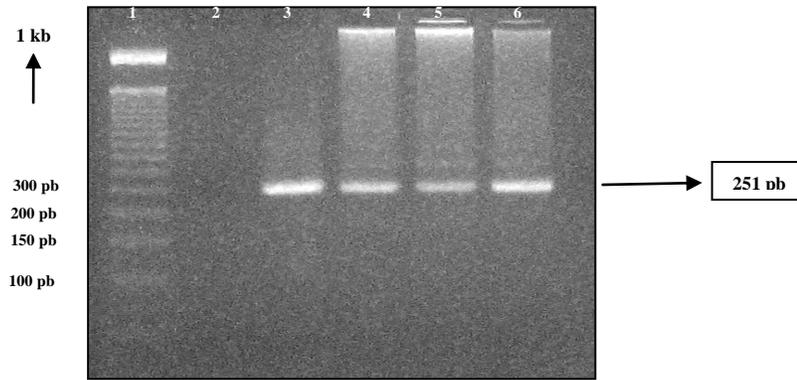


Figura 16. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los amplificados resultantes de la PCR en granos verdes de café. En el carril (1) se muestra el marcador, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) se muestra a la variedad Robusta, en el carril (4) a la variedad Arábica, en el carril (5) la variedad Robusta y en el carril (6) la variedad Robusta.

En la figura 16, se muestran los amplificados resultantes de la PCR de ambas variedades de café, los cuales tienen un tamaño de 251pb y se procede a la digestión de la muestra amplificada con la enzima *Psu I* (ver figura 17).

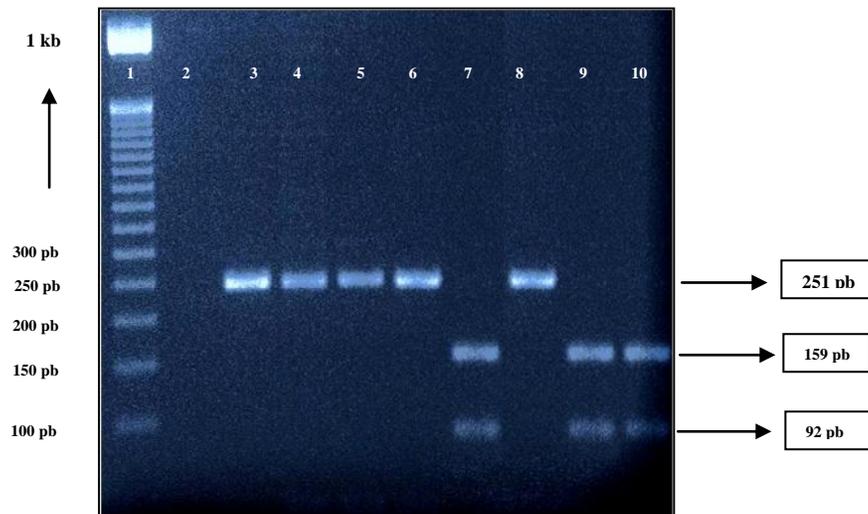


Figura 17. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los fragmentos resultantes del RFLP después de la digestión con la enzima *Psu I*, en grano verde de café de las variedades Arábica y Robusta. En el carril (1) se muestra el marcador de peso molecular, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) se muestra a la variedad Arábica, en el carril (4) a la variedad Arábica, en el carril (5) a la variedad Arábica, en el carril (6) a la variedad Arábica, en el carril (7) a la variedad Robusta, en el carril (8) a la variedad Arábica, en el carril (9) a la variedad Robusta y en el carril (10) a la Robusta.

De acuerdo a la figura 17, podemos mencionar que se llegó a la identificación de las variedades Arábica (*Coffea arábica*) y Robusta (*Coffea canephora*) en café nacional empleando la PCR-RFLP en grano verde, pues se corrobora que la enzima *PvuII* ubica un sitio de restricción presente en Robusta, dando dos fragmentos uno de 92 y otro de 159 pb, mientras que en Arábica está ausente con una diana intacta de 251 pb. De manera posterior, se trabaja con café ya tostado y procesado; siguiendo la metodología planteada por el kit ZR Plant/Seed de Zymo Research de la empresa Fermentas, mostrándose los resultados en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados obtenidos de la extracción de DNA en el café procesado (molido) de distintas marcas comerciales con el kit ZR Plant/Seed de Zymo Research de la empresa Fermentas.

Marca	Concentración (ng/μl)	Relación (260/280)
Blasón "a"	31.66	0.92
Legal "a"	47.68	0.94
Vips "a"	49.26	0.91
Blasón "b"	30.61	0.88
Legal "b"	52.44	0.93
Vips "b"	25.00	0.91

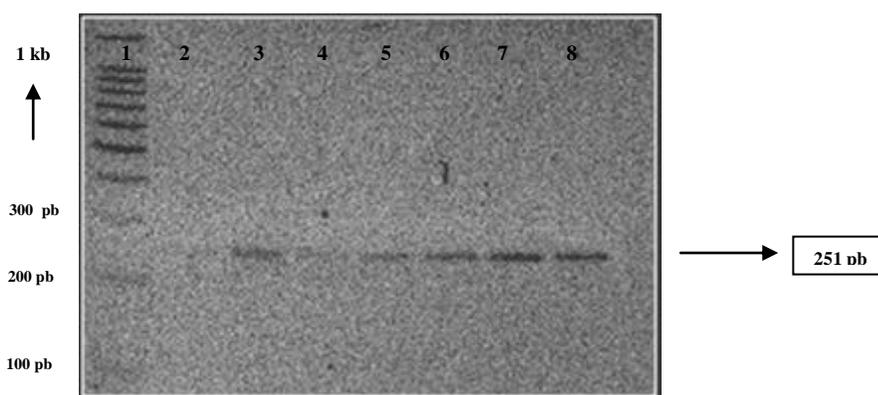


Figura 18. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los amplificadores resultantes de la PCR en café tostado y procesado. En el carril (1) se muestra el marcador de peso molecular, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) se muestra Blasón a, en el carril (4) se muestra Legal a, en el carril (5) se muestra Vips a, en el carril (6) se muestra Blasón b, en el carril (7) se muestra Legal b, y en el carril (8) se muestra Vips b.

Como se puede apreciar en la figura 18, los amplificadores resultantes de la PCR, son demasiado tenues, por lo que el hacer el RFLP sobre estas sería nada notable; cabe mencionar que (3 y 6); (4 y 7); (5 y 8) pertenecen a la misma muestra, solo que se utilizó 1µl de DNA en 3, 4 y 5 mientras que para 6, 7 y 8; 2 µl de DNA para la PCR y determinar donde se obtenía un mejor amplificado.

El principal problema en el análisis de secuencias de DNA para muestras comerciales de café radica en su degradación durante el procesamiento, pues los ácidos nucleicos se descomponen de manera rápida a altas temperaturas, como las alcanzadas en la torrefacción (hasta 245 °C), [43] por lo que el DNA extraído de granos tostados es fragmentado y desnaturalizado, haciendo el análisis más difícil, pues varias son las publicaciones donde se menciona el uso de distintas técnicas y kits comerciales para la obtención de los amplificadores, sin embargo no garantizan resultados exitosos. [43,56]; además se hizo uso de una muestra ya molida (fragmentada) no consiguiendo verificar la existencia de embriones. Y además por que se llegan a utilizar aditivos como azúcares y saborizantes artificiales o conservadores, que pueden actuar como inhibidores de la PCR. [59]

Por lo tanto se buscó otra opción, la cual implicó el trabajar con muestras en grano de café tostado, siguiendo el protocolo del kit comercial ZR Plant/Seeds DNA de Zymo Research de la empresa Fermentas (ver apartado 4.3.1 del capítulo 4), ocupándose para la extracción del DNA los embriones de los granos tostados, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados obtenidos de la extracción de DNA en el café en grano tostado de distintas marcas comerciales con el kit ZR Plant/Seed de Zymo Research de la empresa Fermentas.

Marca	Concentración (ng/µl)	Relación (260/280)
A) "Villarias"	47.29	0.91
B) "Villarias"	28.57	0.90
C) "Mahuer"	48.00	0.90
D) "Villarias"	31.14	0.90
E) "Villarias"	36.42	0.80

Como se puede observar en la tabla 18 (ver tabla 18), los valores de concentración de DNA no son cercanos a los 40 ng/μl en algunos casos, pero no se descartó ninguna muestra. Por otra parte, los bajos valores de la relación de absorbancia (260/280), nos dan la indicación de posibles contaminantes, sin embargo se realiza en análisis posterior, la PCR., mostrándose los amplificados resultantes en la figura 19.

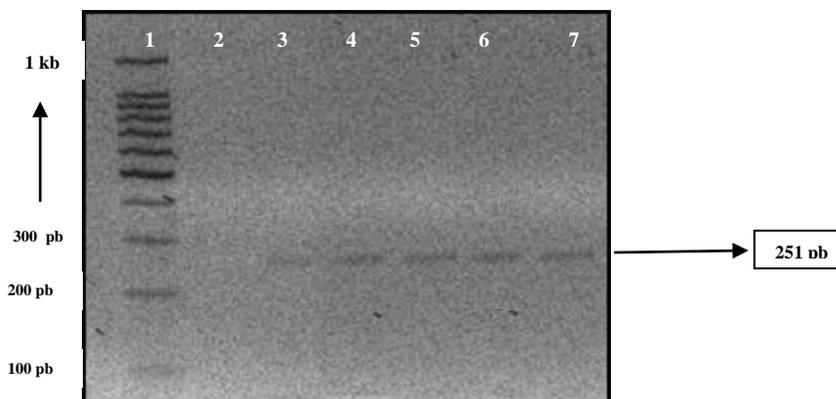


Figura 19. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los amplificados resultantes de la PCR en café en grano tostado. En el carril (1) se muestra el marcador de peso molecular, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) se muestra el tostado en grano 1, en el carril (4) se muestra el tostado en grano 2, en el carril (5) el tostado en grano 3, en el carril (6) el tostado en grano 4, y en el carril (7) el tostado en grano 5.

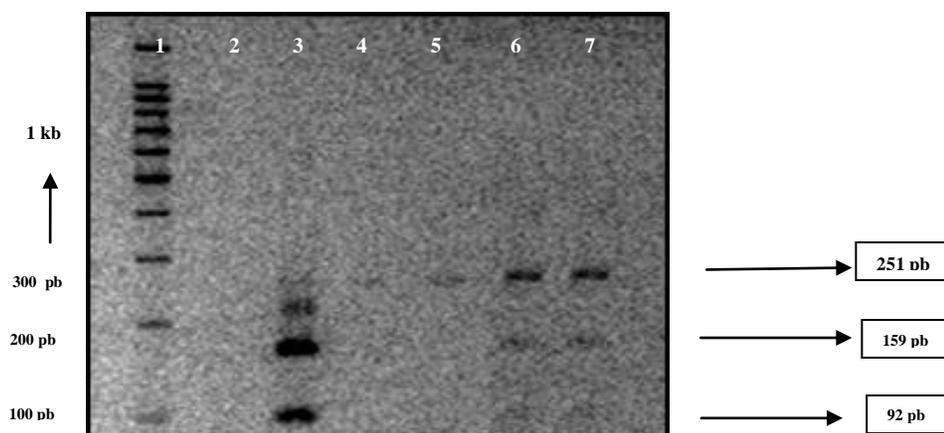


Figura 20. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los fragmentos resultantes del RFLP en café en grano tostado. En el carril (1) se muestra el marcador de peso molecular, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) se muestra el tostado en grano 1, en el carril (4) se muestra el tostado en grano 2, en el carril (5) el tostado en grano 3, en el carril (6) el tostado en grano 4, y en el carril (7) el tostado en grano 5.

Los resultados de la figura 20 (ver figura 20), nos suponen una adulteración, [43, 44, 56, 57] al adicionar granos de las dos variedades Arábica (*Coffea arabica*) y Robusta (*Coffea canephora*) para su venta comercial, lo cual no es declarado en la etiqueta; tal es el caso del carril 3, 6 y 7; donde se muestran las tres bandas; una que corresponde a la variedad Arábica (251 pb) y dos que corresponden a la variedad Robusta (una de 92 y otra de 159 pb), después de haber hecho la digestión con la enzima *Pvu I* sobre el amplificado de PCR, se pone de manifiesto la mezcla de variedades. Sin embargo después del tiempo transcurrido en la experimentación, se plateó el uso de otro kit comercial con el plus de ofrecer una PCR directa, sin la necesidad de llevar a cabo la extracción de DNA, pues cuenta con una enzima altamente afín al mismo, sin ser previamente purificado, además de utilizarse un mínimo de muestra (de 0.5 a 1 µg), su nombre es Phire Plant Direct PCR de Finnzymes.

Para estandarizar la técnica con éste kit se utilizan distintas cantidades de muestra, para determinar cual nos daba un amplificado más intenso.

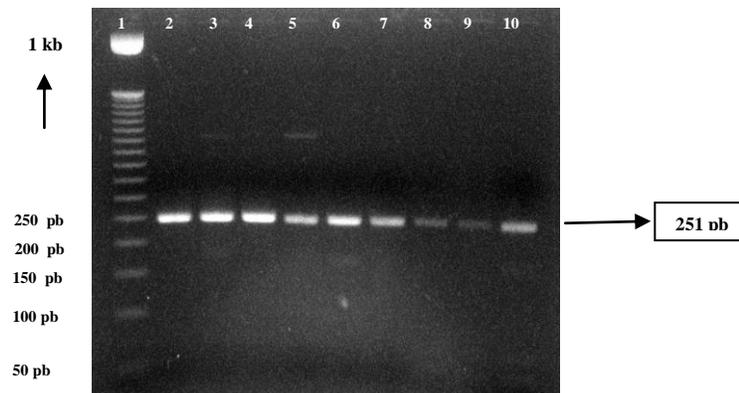


Figura 21. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los amplificados resultantes de la PCR en café en grano tostado. En el carril (1) se muestra el marcador de peso molecular, en el carril (2, 3 y 4) la misma muestra de Arábica en el carril (5, 6 y 7) la misma muestra de Robusta y en el carril (8, 9 y 10) la misma muestra de Robusta expreso grano tostado. El carril (2) contiene 1 embrión de café verde variedad Arábica, diluido con 100 µl de agua libre de nucleasas, tomando de ahí .5 µl como muestra, el carril (3) contiene 1 embrión de café verde de la variedad Arábica diluido con 200 µl de agua, tomando de ahí .5µl como muestra; y el carril (4) contiene 0.5 µg de tejido del embrión de café verde. El mismo procedimiento se lleva a cabo para los carriles (5, 6 y 7); sin embargo ahora la variedad de grano verde es Robusta. Y en los carriles (8, 9 y 10) se tiene el mismo procedimiento pero ahora de un embrión de café en grano tostado.

Como se observa en la figura 21, se tiene un amplificado de 251 pb para todas las muestras, unas bandas más visibles que otras debido a la cantidad de muestra utilizada, ya que en unos se utilizaron los embriones diluidos con agua libre de nucleasas, mientras que en otros se utilizó el tejido de manera directa.

A continuación se muestra el RFLP de las muestras que presentaron un amplificado más intenso -3, 6 y 10- de la figura 21 (ver figura 22), lo que implicó un embrión de la variedad en cuestión, diluida con 200 µl de agua, tomando 0.5 µl para la PCR. En cuanto al RFLP las condiciones fueron las mismas.

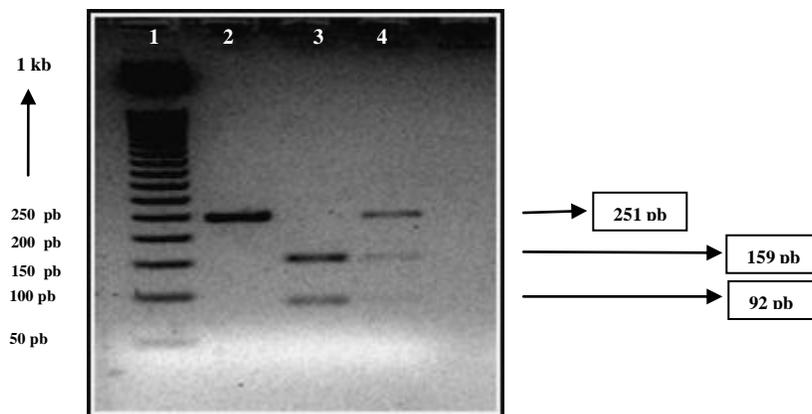


Figura 22. Fotografía de un gel de agarosa al 3%, que muestra los fragmentos resultantes del RFLP en café en grano tostado. El carril (2) tenemos a la variedad arábica, en el (3) a la Robusta y con el resultado del carril (4), Robusta expreso (grano tostado); se puede constatar que no se está en presencia de una adulteración de granos de café Arábica con Robusta, pues se utilizó solamente un embrión para el análisis; sino de un híbrido o un transgénico.

Al observar la figura 22 nos damos cuenta que en el carril 4 se presentan las tres bandas, una que corresponde a la variedad Arábica (251 pb) y dos que corresponden a la variedad Robusta (una de 92 y otra de 159 pb), esto no puede suponerse como adulteración, sino que revela la presencia de un híbrido o un transgénico; [4] pues se utilizó solamente un embrión para el análisis. La presencia de un híbrido se justifica con el mejoramiento de la productividad, logrando mayor rendimiento de la plantación. Al igual de hacer al cafeto más resistente a parásitos como nematodos y enfermedades como la roya del café. Esto mediante el injerto de la variedad Arábica sobre patrones de Robusta; [2,22] aunque podría revelarse también la presencia de un

transgénico, pues una de las empresas más importantes en la venta de café en el mercado interno mexicano ha pedido la patente.

En los últimos años han ido en aumento los experimentos sobre la incorporación de genes foráneos con la finalidad de regular la producción de ciertas sustancias (cafeína, etileno, etc); hacerla más resistente a herbicidas y a malos climas, entre otras. [53] No se trata de justificar o no el uso de la biotecnología al incorporar genes distintos a los pertenecientes originalmente a éstas dos variedades, pues la finalidad es ofrecer un beneficio conjunto; un producto de mayor calidad, o como lo solicita el consumidor según sus necesidades [1] sin embargo debería de ponerse de manifiesto su presencia ya sea como híbrido o transgénico en el empaque, o hacerse la correspondiente aclaración a los interesados en su consumo.

CONCLUSIONES

- Se realizó la búsqueda del genoma completo del café de la variedad Arábica (*Coffea arábica*) y Robusta (*Coffea canephora*), para lo cual se utilizaron programas bioinformáticos y bancos de secuencias; sin embargo solo se encontró el de la primera variedad, correspondiendo al genoma de cloroplasto.
- A partir del genoma de cloroplasto de la variedad Arábica (*Coffea arábica*), se procedió a ingresar los primers consultados en la literatura a otro programa bioinformático (blast2 sequences), arrojando como resultado que el primer frontal se ubica de la posición 48308 a la 48328, mientras que el reverso de la 48534 a la 48558. El tamaño del amplificado resulta en una diana de 251 pares de bases.
- La técnica de amplificación por PCR, es un método sensible y reproducible, capaz de proporcionar resultados de pruebas, incluso cuando la cantidad de DNA fue mínima o se encontraba degradada.
- Se analizó una secuencia del cpDNA, que está presente en alto número de copias, lo que aumentó la posibilidad de obtener amplicones intactos.
- A partir de la estandarización de la técnica de PCR, así como del uso de un RFLP, se concluye la existencia de posibles adulteraciones al igual de la existencia de híbridos o transgénicos. [4]
- Se logró cumplir con el objetivo del proyecto, llegar a la identificación de las variedades Arábica (*Coffea arábica*) y Robusta (*Coffea canephora*) en café nacional empleando la técnica de PCR-RFLP, esto en grano verde de café, y en el ya tostado en algunos casos debido a su degradación durante el proceso de torrefacción.

- La adulteración de una variedad con otra en el café, no representan un problema de salud, pero si uno de abuso por parte de productores y distribuidores al pretender un mayor rendimiento y por tanto ganancia con esta actividad, dejando de manifiesto el desconocimiento del mercado mexicano en las características y atributos de un café de calidad, ya que en base a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se revela que el café destinado para consumo interno ofrecido en distintas casas comerciales suele estar adulterado, mientras aquel destinado al mercado de exportación es 100% auténtico.

- Este trabajo de investigación cumplió con las expectativas planteadas, logrando la diferenciación de ambas variedades (arábica y robusta) en el café mexicano, lo que nos lleva a confirmar que la técnica de PCR-RFLP, así como la metodología trazada son la mejor opción y representan una herramienta capaz de ser tomada en cuenta por las instituciones pertinentes como un análisis efectivo de discriminación y autenticación, asegurando la calidad del café en materia prima, y en el tostado y procesado en algunos casos; esto a pesar de posibles inhibidores en las reacciones enzimáticas, tales como la presencia de proteínas distintas al DNA, lípidos, carbohidratos, reacciones enzima-sustrato, etc., ó parámetros como la temperatura y tiempo que limitan la efectividad de aquellas metodologías basadas en el análisis de proteínas, lo que pone por encima a las técnicas basadas en el DNA, al ser una molécula más estable.

RECOMENDACIONES

En el caso de las muestras de café soluble puede plantearse una región distinta a la (trn- L/trn F) del genoma de cloroplasto del café arábica o robusta que se cree en base a la teoría pueda permanecer intacta a pesar del tratamiento térmico al que se someten las muestras.

El estudio aquí planteado tiene la posibilidad de ser complementado a futuro.,

Realizando quizá gráficas relacionando la intensidad de las bandas de DNA con concentraciones conocidas de las variedades de café, lo cual permitiría determinar el porcentaje de adulteración ó...

Realizando curvas combinando parámetros como la temperatura, el tiempo de procesamiento de tostado del café y la intensidad de las bandas de DNA para establecer hasta que condiciones puede ser efectivo el análisis.

REFERENCIAS

1. Abdulmawjood, Amir. 2009. Aplicación de tecnologías basadas en el DNA/RNA monitoreando la seguridad y calidad de los alimentos. Tesis Maestría/Doctorado. Universidad Justus Liebig. Giessen, Alemania.
2. Acevedo, B.F., Navarro, L., Constantino, L., Gil, Z., Benavides, P. 2007. Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. Cenicafé, Colombia, 58(2)134-141.
3. Agolti, G., Codutti, A., Vera, C.A., Campos, C.R., Nora, C.B. 2007. Tecnología del DNA recombinante. Facultad de medicina. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. 34pp.
4. Alimentos transgénicos. Principios básicos y métodos de detección. 2003. Centro tecnológico ainia. Valencia, España. 24pp.
5. Amplificación de DNA in vitro. PCR (Polymerase Chain Reaction) [en línea] Puerto Rico. Consultado el 15 de Agosto del 2010. Disponible en: URL: <http://www.sumanasinc.com/webcontent/anisamples/molecularbiology/pcr.html>
6. Aseeva, Elena. 2005. Tesis para obtener el grado de doctorado. Facultad de Biología de la Universidad de Ludwig-Maximilians Munich, Alemania.
7. Aserca-DGOF-DAEM. 2001. El Mercado de café en México [en línea]. SAGARPA. México. Consultado en Abril del, 2009. Disponible en: URL: <http://www.cefp.gob.mx/intr/edocumentos/pdf/cefp/cefp0542001.pdf>
8. Aserca-DGOF-DAEM. 2008. Mercado internacional del café [en línea]. SAGARPA. México. Consultado en Abril del, 2009. Disponible en: URL: <http://www.aserca.gob.mx/sicsa/analisis/cafe>.
9. Azofeifa, D.A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas: Aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana, 17(2): 221-242.
10. Bonet R.L. 2004. Los métodos serológicos y moleculares en la tipificación de antígenos de leucocitos humanos. Bioquímica, octubre-diciembre, 29 (004):126-130.
11. Briandet, R., Kemsley, E.K., Wilson, R.H. 1996. Discrimination of Arabica and Robusta in instant coffee by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. J. Agric. Food Chem, 44 (1), pp 170–174.
12. Cadena agroalimentaria del café. 2003 .Programa estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología del estado de Chiapas. Fundación produce y Tecnológico de Monterrey. Chiapas. 58pp.
13. Calidad de café tostado, en grano o molido. 2001. [en línea] no. 289. Consultado en el 2009. Disponible en: URL: http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_01/Cafe.pdf

14. Clegg, M.T. 1993. Secuencias de genes del cloroplasto y el estudio de la evolución de las plantas. PNAS USA. EE.UU. PNAS. 90:363-36790:363-367
15. Clegg, M.T., Cummings, M.P., Durbin, M. 1997. The evolution of plant nuclear genes. EE. UU. PNAS. 94:7791-7798
16. Cortazar, M.A., Silva, R.E.P. 2004. Métodos físico-químicos en Biotecnología PCR. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 40pp.
17. Cortijo, J.D. El mundo del café. 2008. [en línea] Cataluña, España. Consultado en Marzo del 2009.
18. Cowrie Genetic Database Project. 2005. [en línea] Florida, U.S.A. Consultado en Diciembre 2010.
19. Cros, J., Combes, M., Trouslot, P., Anthony, F., Hamon, S., Charrier, A., and Lashermes, P. 1998. "Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L". Molecular Phylogenetics and Evolution, 9:109–117.
20. Cultivo del café. 2007 [en línea] Chile. Consultado en Marzo del 2009. Disponible en: URL: <http://www.abcagro.com/herbaceos/industriales/cafe.asp>.
21. Curtis, S., Clegg, M.T. 1984. Evolución molecular de secuencias de ADN del cloroplasto. Mol. Mol. Biol. Biol. Evol. 1:291-301 1:291-301
22. Desarrollo de tecnologías para la producción de café arábigo orgánico. 2003. Injertación de variedades de café arábigo sobre patrón de café robusta [en línea]. COFENAC. Ecuador. Consultado el 15 de Agosto del 2010. Disponible en: URL: <http://www.cofenac.org/documentos/Injertacion-en-cafe>.
23. Dixon, R.A., Dey, P.M., Lamb, C.J. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol; 55:1–136.
24. Echeverri, D., Buitrago, L., Montes, F., Mejía, I., González, M. del P. 2005. Café para cardiólogos. [en línea] Colombia, vol.11 no.8. Consultado en Marzo 2009. Disponible en: URL: <http://www.scielo.unal.edu.co/scielo>
25. Ecos del café. Botánica del café [en línea] Puerto Rico. Consultado en Febrero del 2009. Disponible en: URL: <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id51.htm>.
26. Erlich, H.A. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. Stockton Press, NY.
27. Erlich, H.A. y N. Arnheim. 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. Ann. Rev. Genet. 26:479-506.
28. Estonba, A., Manzano, C. 2007. R c Aplicación de la tecnología del ADN en la seguridad y calidad agroalimentaria. Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal (UPV/EHU). 16 pp.
29. Flores, E., Vindas. 1999. La planta estructura y función. Libro universitario regional. Cartago, Costa Rica.

30. García, C. A. M. 2006. Aplicación de una técnica de cromatografía de exclusión molecular para la purificación de ADN en plantas de *Coffea* sp. Rev. Fac. Nal. Agr. vol. 59 n. 2. Medellín, Colombia
31. García, P.H.M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Laboratorios Beterá, 1(2):31-41.
32. Gil-Agusti, M. T., Campostrini, N., Zolla, L., Ciambella, C., Invernizzi, C., Righetti, P.G. 2005. "Two-dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species". Proteomics, 5, 710-718.
33. González, de M.C. 2007. Producción de café en Honduras: Modelado de las relaciones cafeto-arbolado. Tesis de Ingeniero agrónomo. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España.
34. Gotas de café. Boletín informativo. PROCAFÉ. 2006 [en línea]. El Salvador. Consultado en Marzo 2009. Disponible en: URL: www.procafe.com.sv.
35. Griffiths, A.J.F., Miller J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., and Gelbart, W.M. 1996. An introduction to genetic analysis (6th edn.). W.H. Freeman and Co., NY.
36. Hee, W.K., Young, G.C., Ung, H.Y., Moo, Y.E. 1998. A rapid DNA Extraction Method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. Plant Molecular Biology Reporter, 16: 1-9.
37. Ikerketa, E. 2009. Encuentros sectoriales Universidad-Empresa. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea. España. 128pp.
38. Kemsley, E. K., Ruault, S., Wilson, R. H. 1995 "Discrimination between *coffea-Arabica* and *coffea-Canephora* variant Robusta beans using infrared-spectroscopy". Food Chem, 54, 321-326.
39. Lashermes, P., Combes, M. C., Cros, J., Trouslot, P., Anthony, F., Charrier, A. 1995. "Origin and genetic diversity of *coffea arabica* L. based on dna molecular markers". CATIE, Costa Rica.
40. López, C.P.A. 2003. Mejoramiento del rendimiento en el proceso de extracción de café de la empresa DECAFÉ S.A. Tesis Ingeniera Química. Universidad Nacional de Colombia. Manizales, Colombia
41. Lopez, M., Mallorquín, P., Vega, M. 2003. Tecnologías moleculares de trazabilidad Alimentaria. Informe de vigilancia tecnológica. Genoma. España.
42. Manual del participante. Beneficio ecológico, tostado, molido y envasado del café. 2001 [en línea] México. Consultado en Marzo del 2009. Disponible en: URL: http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/Benef_ecol_tost_mol_Caf_.pdf
43. Martellosi, C., Taylor, E., Lee, D., Grazioso, G., Donini, P. 2005. "DNA extraction and analysis from processed coffee beans". J. Agric. Food Chem, 53: 8432-8436.
44. Mishra, K. M., Sandhya, R. N., Ram, S. A., Sreenath, H. L., and Jayarama. 2008. "A simple method of DNA extraction from coffee seeds suitable for PCR analysis". African Journal of Biotechnology, 7(4): 409-413.

45. Newton, C.R. and A. Graham. 1994. PCR, part 1: Basic principles and methods. EngBios Scientific Publishers, Oxford.
46. Olvera, F. 2004. Perfil del café. COVECA. Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. Veracruz, México.
47. Ospina, R.M. 1880. Cultivo del café. Nociones elementales al alcance de todos los labradores. Colombia, Medellín, 228 pp.
48. Pérez, J.L., Murillo, R., Gómez, R. 2005. Espectroscopías infrarroja y Raman. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional autónoma de México.
49. Prieto, D.Y.A. 2002. Caracterización física del café semitostado. Tesis Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería Química. Bogotá, Colombia.
50. Procida, G., Campisi, B., Seraglia, R., Traldi. 2003 "Classification of green coffee beans by differences in protein composition obtained by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry". Rapid Commun. Mass Spectrom, 17, 140-148.
51. Ritland, K., Clegg, M. T. 1987. Evolutionary Analysis of Plant DNA Sequences. American Naturalist; vol. 130, pp S74–S100.
52. Rodríguez A.R. 2010. Manual de Prácticas de genética y cuaderno de trabajo. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias, México.
53. Samson, N., Bausher, M. G., Lee, Seung-Bum., Jasen, R. K., Daniell, H. 2007. "The complete nucleotide sequence of the coffee (*Coffea arabica* L.) Chloroplast genome: organization and implications for biotechnology and phylogenetic relationships amongst angiosperms". Plant Biotechnology Journal, 5 339-353.
54. Sánchez, V.L. 2008. Memoria de prácticas. Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA). Laboratorio del Ebro. San Adrián (Navarra), España. 7pp.
55. Spaniolas, S., May, S., Bennett, M., and Tucker, G. 2006. "Authentication of coffee by means of PCR–RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 7466–7470.
56. Spaniolas, S., Tsachaki, M., Bennett, M., Kalaitzis, P., and Tucker, G. 2007. "PCR–RFLP and lab-on-a-chip technology as a means to authenticate roasted coffee beans". Proceedings of the fifth international congress on food technology, 2, 365-370.
57. Thiago, N.C.L do L. 2009. Detection of adulterations in processed coffee with cereals and coffee husks using capillary zone electrophoresis. Departamento de Química Fundamental, Universidad de Sao Paulo, Brasil. J.Sep.Sci, 32, 3507-3511.
58. Uraga, B.C., Guijarro, M.M del C., Pozas, T.R., Blanco, L.A. 2002. Algunos principios activos del café, del té y del cacao. Grupo de trabajo QUIMESCA. Málaga, España. 4pp.

59. Wilson, I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. American Society for microbiology. 63(10):3741-3751.
60. Yábar, V.C. 2003. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú.
61. Zonas del cloroplasto. [en línea]. Consultado el 15 de Agosto del 2010. Disponible en: URL; <http://biodepartamento3.blogspot.com/>.
62. Zonas del cloroplasto y tilacoides. [en línea]. Consultado el 15 de Agosto del 2010. Disponible en: URL; <http://magufos.com/es/4761/fotosintesis>.

ANEXO

Para llevar a cabo este proyecto fue necesario realizar una investigación bibliográfica de los trabajos hechos con anterioridad referentes al tema de interés. Se encontró uno publicado por *Spaniolas, 2006*, cuyo objetivo fue la autenticación de granos de café por análisis de PCR-RFLP y electroforesis capilar. El interés nuestro fue lograr la discriminación de estas dos variedades (*Coffea arabica* y *Coffea canephora*) en café nacional, para lo cual tomamos como referencia el artículo antes citado.

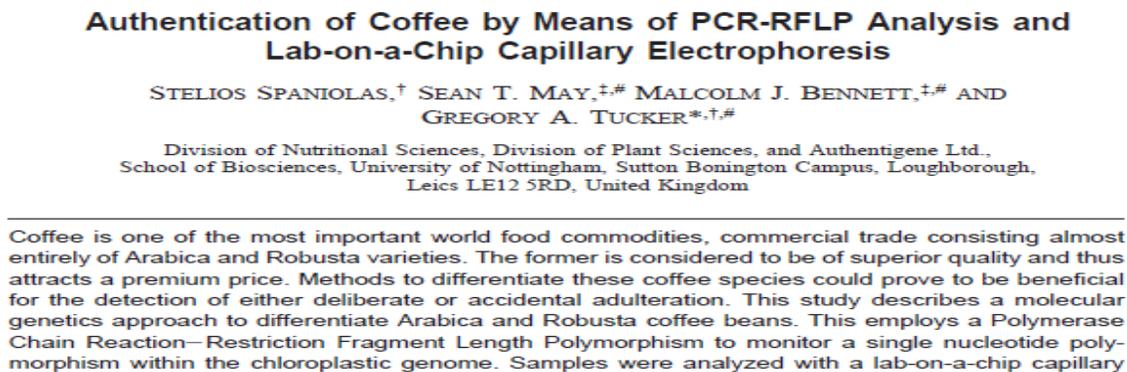


Figura 23. Presentación del artículo publicado por *Spaniolas, 2006*.

Se realizó la búsqueda de la secuencia del genoma del café Arabica (*Coffea arabica*) y Robusta (*Coffea canephora*) sin embargo, solo se encuentra el de la primera especie, el cual fue ubicado en un banco de secuencias llamado NCBI.

El Gi que le corresponde a la especie de café Arabica es; 116242143. Especie: Café Árabe. Genoma de Cloroplasto. Secuencia Completa.

Lo cual es demostrado en la siguiente figura;



Figura 24. Muestra de la ubicación del genoma del cloroplasto de la especie de café Árabe en NCBI.

A partir de la secuencia del genoma de cloroplasto de la especie de café Arabica (*Coffea arabica*) se procedió a determinar la posición de los primers, así como el tamaño del amplificado con la ayuda de un programa bioinformático llamado blast 2 sequences, al ingresar los primers correspondientes, frontal y reverso respectivamente, así como el genoma de cloroplasto del café.



Figura 25. Muestra del programa bioinformático blast 2 sequences en la web.

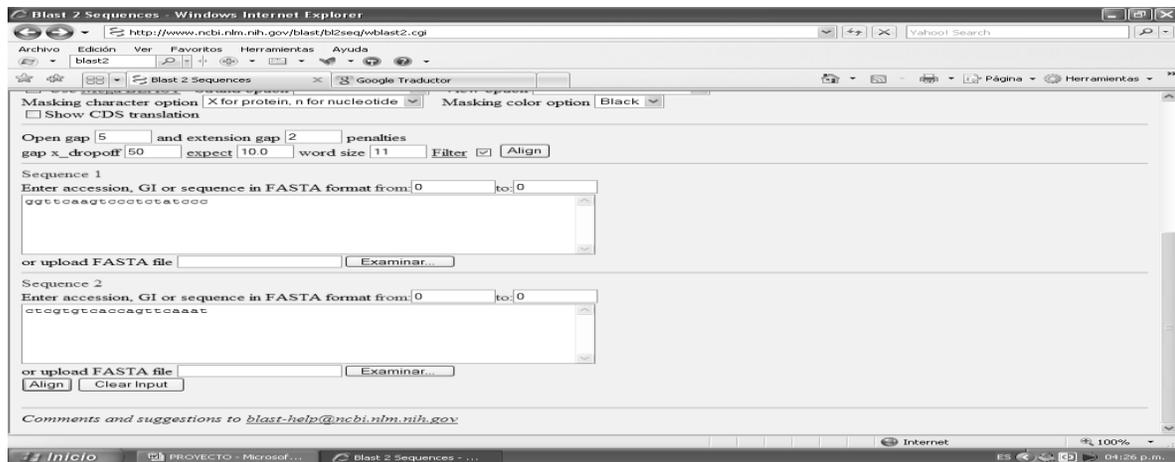


Figura 26. Muestra del ingreso de los primers al programa bioinformático blast 2 sequences.

El diseño de la PCR con la finalidad de obtener una secuencia del cpDNA de manera amplificada, fue hecho a partir de la revisión bibliográfica, que involucró trabajos realizados sobre el café: *Spaniolas, 2006* (ver **ANEXO** figura 25); *Martellossi, 2005*; *Mishra, 2008*, así como también se hizo necesario el empleo de una enzima de restricción [10] la cual tiene el nombre de *Psu I*.

A continuación se muestran las proteínas sintetizadas por los genes del cpDNA del café Arábica (*Coffea arabica*):

Proteínas codificadas 85

Tabla 18. Proteínas codificadas en el genoma de cloroplasto

1. photosystem II protein D1	2. photosystem II cytochrome b559 alpha subunit
3. maturase K	4. cytochrome b6/f complex subunit VI
5. ribosomal protein S16	6. cytochrome b6/f complex subunit V
7. photosystem II protein K	8. photosystem I subunit IX
9. photosystem II protein I	10. ribosomal protein L33
11. ATP synthase CF1 alpha subunit	12. ribosomal protein S18
13. ATP synthase CF0 subunit I	14. ribosomal protein L20
15. ATP synthase CF0 subunit III	16. ribosomal protein S12
17. ATP synthase CF0 subunit IV	18. clp protease proteolytic subunit
19. ribosomal protein S2	20. photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein
21. RNA polymerase beta' subunit	22. photosystem II protein T
23. RNA polymerase beta	24. photosystem II protein N
25. RNA polymerase beta subunit	26. photosystem II phosphoprotein
27. cytochrome b6/f complex subunit VIII	28. cytochrome b6
29. photosystem II protein M	30. cytochrome b6/f complex subunit IV
31. photosystem II protein D2	32. RNA polymerase alpha subunit
33. photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein	34. ribosomal protein S11
35. photosystem II protein Z	36. ribosomal protein L36
37. ribosomal protein S14	38. translational initiation factor 1

39. photosystem I P700 apoprotein A2	40. ribosomal protein S8
41. photosystem I P700 apoprotein A1	42. ribosomal protein L14
43. photosystem I assembly protein ycf3	44. ribosomal protein L16
45. ribosomal protein S4	46. ribosomal protein S3
47. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit J	48. ribosomal protein L22
49. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K	50. ribosomal protein S19
51. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 3	52. ribosomal protein L2
53. ATP synthase CF1 epsilon subunit	54. ribosomal protein L23
55. ATP synthase CF1 beta subunit	56. hypothetical chloroplast RF2
57. ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	58. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 2
59. acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase beta subunit	60. ribosomal protein S7
61. photosystem I subunit VIII	62. ribosomal protein S12
63. photosystem I assembly protein ycf4	64. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 5
65. chloroplast envelope membrane protein	66. ribosomal protein L32
67. cytochrome f	68. cytochrome c heme attachment protein
69. photosystem II protein J	70. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 4
71. photosystem II protein L	72. photosystem I subunit VII
73. photosystem II cytochrome b559 beta subunit	74. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 1
75. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 4L	76. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 7
77. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 6	78. ribosomal protein S15
79. NADH-plastoquinone oxidoreductase	80. hypothetical chloroplast RF1

subunit I	
81. hypothetical chloroplast RF2	82. ribosomal protein S7
83. ribosomal protein L23	84. NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 2
85. ribosomal protein L2	

- Fragmento amplificado

Posición en el genoma de cloroplasto (48308 a 48558); tamaño 251 pb

```
Ccccttcgtagcggtcaaaaaaccttattcattactctattctttagaaatcgatctggacggaaa
agccctttcttatacaaatctgtgttattatgatatacataaatgaacatcttgagcaagaaatac
ccattgaatggttacaatcgatataactattcatactgaaactacaaagtactctttttaagatacaa
gaaattctagtagataaaaatttgaatccc
```