



## Métodos de Extração de DNA em Matriz de Café Torrado e Moído

Edna Maria Morais de Oliveira<sup>1</sup>  
Thiago Ferreira dos Santos<sup>2</sup>  
Andressa Moreira de Souza<sup>3</sup>  
Tatiane Corrêa de Oliveira<sup>4</sup>  
Ivanilda Santos de Lima<sup>5</sup>

### Introdução

Nos últimos anos, os consumidores têm demonstrado um maior interesse em relação à procedência e qualidade dos produtos que compram, especialmente do gênero alimentício. A qualidade está diretamente associada à autenticidade dos produtos consumidos. Este fato nos leva a um novo cenário no qual as metodologias de detecção de fraudes/adulterações vêm sendo gradativamente aprimoradas. As adaptações de métodos estão associadas à necessidade de técnicas mais adequadas e sensíveis para atender a demanda de qualidade do consumidor.

Para detecção de fraudes em café as técnicas microscópicas e espectroscópicas atualmente empregadas são menos sensíveis e seletivas, no que se refere à identificação e quantificação de cada tipo de adulterante, além de embutirem certa subjetividade, inerentes a elas. Tais técnicas apresentam melhores resultados quando acopladas a outras ferramentas, como modelagem e métodos quimiométricos. Técnicas mais sensíveis e seletivas, como a cromatografia, ganham força no âmbito da detecção de fraudes. Como não poderia ser diferente, essa técnica vem sendo utilizada na detecção de adulterantes em café. Um fator muito importante para utilização da cromatografia em fraudes de café seria justamente o tipo de adulterante utilizado.

Os principais açúcares marcadores de fraude em café – maltose (indicador da adição de milho), 1-kestose (indicador da adição de trigo e cevada), rafinose (indicador da adição de soja), nistose (indicador da adição de trigo e cevada), 1-b-frutofuranosil nistose (indicador da adição de trigo e cevada) e estaquiose (indicador da adição de soja) – podem, segundo Bernal; Del Alamo; Nozal (2011), ser determinados utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) com combinações apropriadas da fase estacionária e do sistema de detecção (FEMIA; WEINBERGER, 1987); VRÁTNY; BRINKMAN; FREI, 1985; BLANC et.al, 1989).

Dentre as técnicas de maior sensibilidade, além das técnicas cromatográficas, existem as de biologia molecular, como PCR em tempo real, utilizada na detecção de adulterantes em café, como arroz, cevada e milho, que pode ser considerada uma inovação tratando-se de fraudes em café (OLIVEIRA; FERREIRA, OLIVEIRA, 2010).

As informações que devem estar nos rótulos são essenciais para o consumidor escolher um determinado alimento ou preferir uma determinada marca em relação a outra. Métodos mais sensíveis, combinados com protocolos de extrações mais eficientes ajudam a detectar alterações no perfil básico do produto. Neste

<sup>1</sup> Engenheira Química, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

<sup>2</sup> Biólogo, bolsista CNPq-Brasil, Doutorando da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

<sup>3</sup> Química Industrial, M.Sc. em Química Ambiental, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

<sup>4</sup> Química, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

<sup>5</sup> Nutricionista, bolsista do CNPq-Brasil, Rio de Janeiro, RJ.

sentido, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de extração eficiente, para matriz complexa (de difícil extração), como café torrado e moído, que permitisse um incremento na quantidade de DNA, bem como na sua pureza.

## Procedimento Experimental

O método híbrido CTAB/DNeasy Plant mini kit (QIAGEN) foi desenvolvido para apresentar mais etapas de purificação (Figura 1), além de ser mais rápido do que outros métodos de extração de ácido desoxirribonucleico – ADN (desoxirribonucleic acid-DNA).



**Figura 1.** Fluxograma do protocolo de extração. \* DNeasy® Plant Mini Kit; \*\* DNeasy Mini Spin Column.

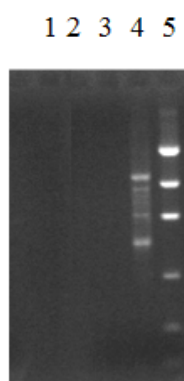
Para avaliar a amplificabilidade dos DNAs genômicos das amostras processadas, foi conduzida análise de PCR-RAPD termociclador GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystem para um volume total de 50 µL nas seguintes condições: 30 ng/µL de DNA, Tampão PCR 1× (20 mM Tris-HCl pH 8.4; 50 mM KCl), 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de desoxinucleotídeos trifosfatados dNTPs, 0.15 U/µL DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e primers OPW 15 Operon Eurofins contendo 20 µM em solução final. O termociclador foi calibrado nas seguintes condições de reação: 40 ciclos com desnaturação inicial (95 °C por 5 min), mais 50 s a 95 °C, temperatura de anelamento de 55 °C por 50 s e temperatura de polimerização de 72 °C por 50 s e ao término submetido a 70 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram

preparados com azul de bromofenol (tampão corante) para corrida em cuba de eletroforese, nas condições: 150 mA/ 150 V por 100 min em gel de agarose 2 % (p/v) TAE 1× corado com brometo de Etídio 0.5 µg/mg (LifeTechnologies) e visualizados em transiluminador UV (Vilber Lourmat ECX-20–M).

## Resultados e Discussão

Para a avaliação dos protocolos para extração de DNA das amostras de café torrado e moído, foram testados quatro métodos: CTAB, Dellaporta, DNeasy modificado e o método híbrido CTAB/DNeasy. A escolha de um método para a extração de DNA é de extrema importância para análises em Biologia Molecular, pois o mesmo está diretamente relacionado ao rendimento

e à pureza do DNA. A diversidade e a complexidade das matrizes de cada amostra influenciam na escolha do protocolo de extração mais adequado, minimizando os efeitos dos inibidores, em geral compostos químicos como: compostos fenólicos, polissacarídeos e proteínas, característicos de cada matriz, sobre a enzima DNA polimerase, o que pode comprometer o rendimento da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e apresentar resultados errôneos de detecção como “falso negativo” (FERREIRA et al., 2012, p. 42). Para avaliar a capacidade de amplificação das amostras de DNA obtidas pelos diferentes métodos de extração, foram conduzidas as PCR-RAPD, sendo posteriormente realizada a eletroforese horizontal em gel de agarose, como demonstrado na Figura 2.



**Figura 2.** Isolado de DNA genômico submetida à reação Random Amplification of Polymorphic DNA (PCR-RAPD) para análise de amplificabilidade do DNA genômico. Métodos de extração e padrão: (1) Del-laporta, (2) CTAB, (3) DNeasy e (4) DNeasy/CTAB; (5) padrão de bases.

## Conclusão

Para a matriz café torrado e moído, observou-se que o melhor método de extração foi o método híbrido DNeasy/CTAB, por apresentar mais etapas de purificação, tais como precipitação no complexo formado entre o CTAB e o DNA, centrifugação com clorofórmio que desnatura proteínas tornando-as insolúveis na fase aquosa onde o DNA é solúvel, adsorção em sílica modificada DNeasy e purificação com etanol 70 %.

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que o método de extração adaptado apresentou maior eficiência de extração de DNA em café torrado e moído, comparado a outros métodos.

## Referências

- BERNAL, J. L.; DEL ALAMO, M.; DEL NOZAL, M. J. HPLC Analysis of Carbohydrates in Wines and Instant Coffees Using Anion Exchange Chromatography Coupled to Pulsed Amperometric Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 507–511, 1996.
- BLANC, M. B.; DAVIS, G. E.; PARCHET, J.-M.; VIANI, R. Chromatographic profile of carbohydrates in commercial soluble coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 926-930, 1989.
- FEMIA, R. A., AND WEINBERGER, R. Determination of reducing and non-reducing carbohydrates in food products by liquid chromatography with post-column catalytic hydrolysis and derivatization comparison with refractive index detection. **Journal of Chromatography A.**, v. 402, p. 127-134, 1987.
- FERREIRA, T.; OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, T.; LIMA, I.; VITÓRIO, F.; FARAH, A. Detection of Barley and Corn as Adulterants in Commercial Coffees Using Real-Time PCR. in Commercial Coffees Using Real-Time PCR. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 24., 2012, , Costa Rica. Programme & abstracts. [S. I.]: Association for Science and Information on Coffee, 2012. p. 42.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11292**: Instant coffee - Determination of free and total carbohydrate contents. Method using high performance anion-exchange chromatography. 1st ed. Geneve, 1995. 16 p.
- OLIVEIRA, E. M. M.; FERREIRA, T.; OLIVEIRA, T. C. de. Aplicação da técnica PCR em tempo real para a detecção de adulterantes em café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 22., 2010, Salvador. Potencialidades, desafios e inovações. [S. I.]: SBCTA, 2010. 1 CD-ROM.
- VRÁTNY, P.; BRINKMAN, U. A. T.; FREI, R. W. Comparative study of post-column reactions for the detection of saccharides in liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 224–229, 1985.

## Literatura Recomendada

- REDGWELL, R. J.; TROVATO, V.; CURTI, D.; FISCHER, M. Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 5, p. 421-431, 2002.

## Comunicado Técnico, 209

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agroindústria de Alimentos**  
**Endereço:** Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba  
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ  
**Fone:** (21) 3622-9600 / **Fax:** (21) 3622-9713  
**Home Page:** www.embrapa.br/agroindustria-de  
alimentos  
**SAC:** www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição  
1ª impressão (2015): tiragem (50 exemplares)

## Comitê de Publicações

**Presidente:** Virgínia Martins da Matta  
**Membros:** Ana Iraidy Santa Brígida, André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Leda Maria Fortes Gottschalk, Nilvanete Reis Lima, Renata Torrezan e Rogério Germani

## Expediente

**Supervisão editorial:** Virgínia Martins da Matta  
**Revisão de texto:** Renata Valeriano Tonon  
**Normalização bibliográfica:** Celma R. M. de Araujo  
**Editoração eletrônica:** André Luis do N. Gomes