

VIABILIDADE DA EXTRAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO COM DEGRADAÇÃO GENÔMICA

Andressa Moreira de Souza
Embrapa Agroindústria de Alimentos

Otniel Freitas Silva
Embrapa Agroindústria de Alimentos

Bruna Valentim da Silva
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)

Cleverson Busso
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Ricardo Schneider
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Alessandra de Souza Teixeira
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Gustavo Pontes
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Gustavo Nicolodelli
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

RESUMO

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de café, tanto verde quanto torrado, visando estabelecer um método capaz de garantir maior eficiência nas reações de qPCR utilizadas para genotipagem de espécies de café com elevado grau de degradação do DNA genômico, uma vez que o processo de torra compromete a pureza do DNA isolado e reduz significativamente a quantidade disponível para extração.

Métodos: Foram analisadas amostras de café torrado, classificadas como escuro na escala de 35 Agtron, e de café verde provenientes de seis estados. Essas amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando cinco protocolos de kits comerciais e seis protocolos desenvolvidos *in house*. Em seguida, foram conduzidas reações de amplificação para avaliar tanto a pureza do DNA obtido quanto a eficiência dos diferentes protocolos testados. **Resultados:** Os protocolos correspondentes aos métodos (E) e (K) demonstraram os resultados mais satisfatórios, tanto em relação à pureza do DNA obtido quanto à eficiência das reações de amplificação. **Conclusão:** O protocolo *in house* do método (K), desenvolvido neste estudo, gerou DNA com qualidade adequada para análises de qPCR, permitindo a genotipagem das espécies de *C. arabica* e *C. canephora* por meio de discriminação alélica, após a aplicação da técnica de pré-amplificação.

Palavras-chave: *Coffea*; Discriminação Alélica; Genotipagem; Protocolo de Extração; kit.

INTRODUÇÃO

O café, devido ao seu alto valor de mercado e significativa importância comercial, ocupa a sétima posição dentre os dez principais produtos alimentares que possuem maior risco de fraude (BURNS; WALKER, 2020). Práticas frequentes envolvem desde adulterações na qualidade dos grãos com mistura de espécies ou grãos defeituosos, até mesmo a adição de elementos estranhos, que podem ser de outras partes ou não da planta (TOCI *et al.*, 2016; PEREZ *et al.*, 2021).

Existem duas espécies de café mais comercializadas no mundo, o *Coffea arabica* ou popularmente conhecido como café arábica que apresenta aromas mais complexos, e o *Coffea canephora* ou também conhecido como robusta que tende a apresentar um aroma mais amargo. O CAFÉ arábica além de ter notas mais elaboradas e refinadas, é tradicionalmente cultivado em áreas elevadas apresentando maior susceptibilidade a doenças, por isso, tende a ter maior valor no mercado o que torna constante a prática de misturas com o café robusta (WANG; LIM; FU, 2020). Há relatos que entre 5 a 20% dos denominados cafés “100% arábica” no mundo estejam adulterados com misturas de café robusta (GUNNING *et al.*, 2018). Um estudo de revisão identificou vinte e nove tipos de adulterantes empregados no café, muitos deles fazendo parte da própria planta. Devido à similaridade química, não são detectados por ferramentas analíticas convencionais (CARVALHO COUTO *et al.*, 2022).

A identificação de cafés adulterados com confiabilidade ainda permanece um grande desafio. No Brasil, a legislação atual adota o método microscópico e visual, onde impurezas e matérias estranhas presentes no café torrado e moído são visualizados em lâminas com o auxílio de um microscópio estereoscópico (ANVISA/MS, 2022). Este método, além de ser demorado, depende da experiência do analista e que muitas vezes acaba sendo subjetivo e de baixa confiabilidade (MENDES *et al.*, 2016). Além disso, na moagem há uma clara dificuldade de diferenciação das espécies utilizadas na mistura. Métodos de biologia molecular como genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e mais recentemente a Espectroscopia de Quebra Induzida por Laser (LIBS), podem ser uma alternativa interessante para mitigar o problema.

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas a fim de determinar parâmetros apropriados e marcadores para diferentes tipos de adulteração em café torrado e moído. Técnicas de biologia molecular como a PCR-RFLP (Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição utilizando a Reação de Cadeia da Polimerase) permitem diferenciar espécies pela análise de diferentes padrões (fragmentos) de DNA gerados com o uso de nucleases de restrição. Existem diferentes regiões genéticas conservadas em plantas que podem ser utilizadas como padrão molecular, exemplos são os genes envolvidos na transcrição do RNA ribossômico, bem como genes associados ao genoma do cloroplasto em café (SPANIOLAS *et al.*, 2006; MANNINO *et al.*, 2023). Embora essa técnica é conhecida pela alta confiabilidade dos resultados, é necessário que a amostra apresente condições mínimas de extração íntegra de material genético. Torras escuras e a presença de enzima inibidoras podem ser um problema, hoje na maioria das vezes contornada pelo aperfeiçoamento dos protocolos existentes (BOLÍVAR-GONZÁLEZ *et al.*, 2023). Inúmeros protocolos foram desenvolvidos com o intuito de ter uma amplificação satisfatória do material genético do café em uma amostra (MARTELLOSI *et al.*, 2005).

A extração de ácidos nucleicos é o ponto de partida em qualquer estudo de biologia molecular e, portanto, é considerado um processo crucial. Um protocolo de extração de DNA eficiente deve ser simples, acessível e produzir DNA suficiente com alta qualidade. Atualmente, os métodos de extração de ácidos nucleicos comumente usados são o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e kits de extração comerciais (SINGH *et al.*, 2021). A membrana de sílica é um bom material para extração de ácido nucleico. O DNA pode ser rapidamente adsorvido e eluído usando membranas de sílica em diferentes concentrações de sal (WANG; LIM; FU, 2020; ZHAO *et al.*, 2021). O processamento de alimentos associado ao excesso de calor, atividade de nucleases e pH baixo contribuem para a degradação do DNA, que se torna mais comum em produtos com vida de prateleira longa. A detecção de DNA através da reação de PCR é dificultada em produtos processados por conta do alto nível de degradação e inibidores presentes nas substâncias contidas nos alimentos além das transformadas pelos processamentos, como compostos fenólicos de torra, caramelização de açúcares entre outros. Por esse motivo, é fundamental a utilização de controles de qualidade para evitar resultados falso-negativos, por baixa pureza de

DNA, porque apesar de testes de PCR apresentarem capacidade de detectar DNA em amostras de baixa qualidade, a presença de moléculas inibidoras nos extratos de DNA pode interferir nos resultados das amplificações (SAJIB; BHUIYA; HUQUE, 2017).

Segundo Tan e Yiap (2009), em uma extração de DNA quatro etapas são indispensáveis na purificação de ácidos nucleicos: ruptura do tecido, desnaturação da nucleoproteína, inativação de nuclease e remoção de contaminantes e inibidores da reação em cadeia da polimerase (PCR). Dessa forma, pode-se dizer que um dos maiores desafios para extração de DNA em uma matriz alimentar complexa está na presença de inibidores que podem ser co-purificados com o DNA durante a etapa de extração, o que pode reduzir a eficiência da PCR (COELLO *et al.*, 2017). O DNA isolado pode ser utilizado em uma variedade de aplicações em biologia molecular, incluindo amplificações por PCR, qPCR, sequenciamento, NGS, genotipagem, mapeamento de restrição, clonagem entre outras técnicas. Sendo assim, o DNA deve ser isolado, purificado e concentrado por métodos que garantam a quantidade e a qualidade do DNA necessária de acordo com a aplicação (KAPP *et al.*, 2015, VAHDANI; SAHARI; TANAVAR, 2024). Para uma extração de DNA de alta performance é desejável que não haja presença de RNA, inibidores de PCR e nem DNA fragmentado por cisalhamento de extração, bem como, não fazer uso de reagentes tóxicos neste processo.

Alguns fatores devem ser considerados ao escolher um método apropriado incluem características da amostra como quantidade, tipo, grau de processamento e origem, além de outros fatores como custo, tempo, simplicidade do processo, que afeta a integridade do DNA, equipamento necessário, toxicidade e descarte de reagentes, rendimento e pureza do DNA (DAIRAWAN; SHETTY, 2020).

A avaliação da pureza do DNA medindo a razão de absorbância a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) é uma técnica amplamente utilizada para indicar a presença de, por exemplo, peptídeos residuais e proteínas. Esses compostos exibem forte absorção em torno de 280 nm, produzindo assim baixas razões A_{260}/A_{280} quando coexistem com DNA. Usualmente, uma razão A_{260}/A_{280} variando de 1,7 a 2,0 é aceita como indicativa de DNA puro (HASSAN *et al.*, 2015). Notadamente a absorbância de 260 nm é a mesma entre nucleotídeos, DNA de fita simples e dupla (ss-/ds-) e RNA, o que pode levar a proporções de pureza e concentrações de dsDNA errôneas e superestimadas (VERSMESSEN

et al., 2024). A razão A260/A230 representa outro parâmetro para quantificação espectrométrica de DNA, na qual a razão deve estar entre 2,0 e 2,2 para ser considerado DNA livre de contaminantes, pois razões menores que 2,0 podem significar a presença de contaminantes absorventes de 230 nm, como lipídios, sais e fenóis (LIU; AVRAMOVA; PARK, 2009; USMAN *et al.*, 2014).

A obtenção de DNA do cafeeiro é vista como um processo desafiador e complicado, uma vez que a espécie está propensa a uma alta oxidação, principalmente em suas folhas e frutos. O composto fenólico ácido 5-cafeoilquínico, também chamado de ácido clorogênico (CGA), principal substrato da polifenoloxidase (PFO), é encontrado em grandes quantidades nesses tecidos. Esse composto atua como um mecanismo de defesa contra predadores no organismo da planta, porém sua oxidação representa um grande desafio para a extração de DNA (GOMES, 2019). Os principais desafios na extração de DNA envolvem a obtenção de uma amostra em grande quantidade e qualidade, devido à alta concentração de fenóis em suas folhas, o que pode comprometer os métodos empregados na extração. Isso ocorre porque esses compostos escurecem a amostra e a tornam viscosa, reduzindo sua vida útil e impedindo a realização das etapas subsequentes de análises moleculares (TIBBITS *et al.*, 2006; GOMES, 2019). O grau de complexidade de matrizes alimentares varia de acordo com a sua composição. Alimentos in natura, processados e ultraprocessados apresentam níveis variados tanto de compostos, quanto de concentração, o que pode dificultar a obtenção de DNA com pureza e integridade adequados, assim interferindo no diagnóstico molecular preciso, na identificação inequívoca de espécies e no sequenciamento completo de genomas de espécies. A eficiência de qualquer PCR pode ser avaliada realizando um experimento de série de diluições utilizando o ensaio alvo. Após definir corretamente a linha de base e o limite, a inclinação da curva padrão pode ser convertida em um valor de eficiência. A faixa de eficiência ideal para qPCR deve estar entre 90–100% ($-3,58 \geq \text{inclinação} \geq -3,32$). Se a eficiência for 100%, os valores da diluição seriada de 10 vezes serão separados por 3,3 ciclos. Se a inclinação estiver abaixo de -3,58, a PCR tem baixa eficiência (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2025).

No estudo de Santos (2013) observamos que amostras de café in natura (grão verde/cru) apresentaram resultados de extração de DNA em ng/ μ L de $127,5 \pm 35,5$ com variações nas razões A260/A280 $2,0 \pm 1,9$ e A260/A230 $0,6 \pm$

0,5, usando um método híbrido DNeasy Mini Plant/CTAB. Isolados de DNA de amostras de cafés processados (grão torrados) utilizando o protocolo CTAB, obtiveram resultados de DNA em ng/ μ L de $24,9 \pm 3,6$ com razões A260/A280 e A260/A230 de $1,7 \pm 1,3$ e $1,9 \pm 2,1$, respectivamente, indicando variações de pureza e eficiência de 83, 4% (FRANÇA *et al.*, 2023). Mesmo em amostras da parte foliar de plantas de café a extração de DNA apresenta contaminantes como compostos fenólicos e polissacarídeos difíceis de serem removidos, como observado na extração com SDS/Tris-EDTA/Triton, que apresentaram resultados de DNA em ng/ μ L de $205,47 \pm 115,08$ com razões A260/A280 $1,6 \pm 0,3$ e A260/A230 $1,4 \pm 0,2$ (GOMES, 2019).

MÉTODOS

Protocolo de extração *in house*

Foram testados protocolos extração *in house* para café torrado no ponto de torra de classificação escura na escala de 35 Agtron e café verde, como descritos abaixo, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Montagem de protocolos de extração *in house*.

Reagentes	Métodos de extração de DNA <i>in house</i>					
	CTAB modificado 1	CTAB modificado 2	SDS/STE com F:C 1	SDS/STE com F:C 2	SDS/STE modificado 1	SDS/STE modificado 2
Amostra	1000 mg	250 mg	250mg	250 mg	250 mg	250 mg
Tampão de lise CTAB (pH=8)	x	x	-	-	-	-
Tampão de lise SDS/STE (pH=8)	-	-	overnight	x	x	x
NaOH 1M	-	-	-	-	x	x
Proteinase K 20 mg/mL	x	x	x	x	x	x
Incubar 65°C/ vortexar	30 min./10 min.	01:30h/10 min.	2h/30min.	2h/ 30min.	30min./ 10min. (2x) Coef. Partição	30min./ 10min. (3x) Coef. Partição
Rnase 10mg/mL	x	x	x	x	x	x
Pérolas de vidro	-	x	x	x	x	x
Carvão ativo/ sílica	-	x	x	x	x	overni- ght
Carvão ativo	x	-	x	x	x	x
Sílica	-	x	x	x	-	x
Solução de precipitação CTAB	x	x	-	-	-	-
Clorofórmio	-	x	-	-	x	x
Fenol:Clorofórmio	-	-	x	x	-	-
NaCl 1,2M	x	x	-	-	-	-
Acetato de sódio 3M	-	-	x	x	x	x
Isopropanol	x	x	x	x	x	x
Etanol 70%	x	x	x	x	x	x
Etanol absoluto	-	x	x	x	x	x
Água ultrapura	x	x	x	x	x	x
Coluna de limpeza	amostras torradas	amostras torradas	-	-	x	x

Fonte: Laboratório de diagnóstico molecular – Embrapa Agroindústria de Alimentos. Legenda: F:C = Fenol:Clorofórmio; CTAB = brometo de cetiltrimetilamônio e SDS/STE = dodecil sulfato de sódio/tampão sódio Tris-EDTA.

- Protocolo de extração baseado em CTAB modificado.
- Protocolo de extração baseado em dodecil sulfato de sódio/tampão sódio Tris-EDTA (SDS/STE) com Fenol/clorofórmio.

Protocolo de extração com kits comerciais

Foram selecionados os kits comerciais para extração de café torrado no ponto de torra de classificação escura na escala de 35 Agtron e café verde, como descritos abaixo:

- DNeasy mericon Food Kit nº de catálogo 69514.
- Wizard® Genomic DNA Purification kit nº de catálogo A1125 – protocolo 3.E.
- Wizard® SV Genomic DNA Purification System nº de catálogo A2360 – protocolo 4C.
- ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit nº de catálogo D4300 e um protocolo modificado utilizando o filtro de limpeza Zymo-Spin™ III-HRC Filter do mesmo kit, também na etapa inicial, após a primeira centrifugação do material com tampão de lise.

RESULTADOS

Para fins de comparação do comportamento da extração de DNA de café, utilizou-se amostras de café torrado na classificação escura na escala de 35 Agtron (Figura 1), de 6 estados - Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Espírito Santo e Rondônia, sendo um pool de amostras representativas da espécie arábica (MG, SP, PR, BA, ES) e um pool de amostras representativas da espécie canéfora (ES e RO), além de amostras de café verde (grão cru).

Figura 1. Classificação por meio de coloração de café torrado em sistema de disco Agtron.



Fonte: SCAA – Specialty Coffee Association of America (Associação Americana de Café Especiais).

Extração e quantificação de DNA

As amostras foram submetidas a cada método em triplicata. A média dos resultados de extração de DNA, quantificações e suas razões foram descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados de quantidade e pureza de DNA.

Método	Grão verde/cru			Grão torrado		
	[DNA] ng/μL	Razão A260/A280	Razão A260/A230	[DNA] ng/μL	Razão A260/A280	Razão A260/A230
A	-	-	-	75,6	1,5	0,9
B	143,1	1,2	0,4	33,8	1,2	0,5
C	20,7	1,7	1,1	27,7	1,2	0,4
D	36,1	1,9	1,2	0,9	2,4	0,8
E	146,6	1,8	1,9	70,1	1,4	0,4
F	142,5	1,5	1,1	68	1,5	0,8
G	-	-	-	74,5	1,5	1,0

H	314,5	1,2	0,8	137,8	1,5	1,1
I	214,8	1,4	1,2	107,7	1,5	1,2
J	-	-	-	120,8	1,5	1,3
K	163,9	1,7	1,6	113,3	1,5	1,6

Fonte: Laboratório de diagnóstico molecular – Embrapa Agroindústria de Alimentos. **Legenda:** Métodos – (A): DNeasy mericon Food Kit; (B): Wizard® Genomic DNA Purification kit A1125; (C): Wizard® SV Genomic DNA Purification System A2360; (D): ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit D4300; (E): ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit D4300 modificado; (F): CTAB modificado 1; (G): CTAB modificado 2; (H): SDS/STE com fenol:clorofórmio 1; (I): SDS/STE com fenol:clorofórmio 2; (J): SDS/STE modificado 1 e (K): SDS/STE modificado 2.

DISCUSSÃO

Cafés são ricos em polissacarídeos e compostos fenólicos, tornando o processo de extração de DNA mais dificultoso. Devido às suas características químicas, os polissacarídeos co-precipitam com o DNA, conferindo viscosidade às soluções. Mesmo as amostras de café verde, durante o processo de extração de protocolos que utilizam temperatura, a solução escurece devido à oxidação de compostos fenólicos, como terpenoides e taninos, que se ligam de forma irreversível ao esqueleto fosfato do DNA. Nos protocolos *in house* e no kit comercial do método (B), em que as amostras foram submetidas à lise térmica a 65 °C, observou-se a presença de contaminantes capazes de inviabilizar o uso do DNA em análises moleculares, por interferirem na ação da polimerase ou das endonucleases. Em contraste, os melhores níveis de pureza de DNA em amostras de café verde foram obtidos nos protocolos de kits comerciais que empregaram lise mecânica e/ou enzimática, associada ao uso de membranas de sílica. Entre eles, destacou-se o protocolo modificado do kit comercial do método (E), que apresentou o maior nível de pureza, conforme estabelecido pela literatura e evidenciado na Tabela 2 e na Figura 2, referente ao espectro de quantificação obtido no Espectrofotômetro UV-Vis de microvolume NanoDrop™ One.

Figura 2. Espectro de isolado de DNA com alto nível de pureza.



Fonte: Laboratório de diagnóstico molecular – Embrapa Agroindústria de Alimentos.

O protocolo de extração de DNA do método (K), aplicado tanto em amostras de café verde quanto torrado, apresentou nível adequado de pureza para utilização em qPCR após a etapa de pré-amplificação.

Para avaliar a eficiência das reações, o isolado obtido pelo método (E) em café verde foi adotado como referência, por apresentar elevada razão de pureza. As amplificações dos isolados de DNA de café torrado, provenientes de todos os protocolos, foram comparadas com esse isolado de referência. Ressalta-se que os isolados de café torrado necessitam de pré-amplificação para uso em qPCR destinado à genotipagem. O DNA extraído pelo método (K) demonstrou eficiência de reação superior a 90% em qPCR, valor considerado aceitável pela literatura, enquanto os demais protocolos apresentaram eficiência entre 80% e 89%. Até então, não havia sido relatada em estudos uma eficiência próxima de 90%.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que, especificamente para amostras de café torrado, o protocolo *in house* desenvolvido neste estudo, e baseado em uma combinação de lise térmica, mecânica e enzimática, associada

ao uso de reagentes adsorventes como carvão ativo e sílica, assim podendo apresentar desempenho superior. Esse protocolo foi capaz de gerar isolados de DNA com qualidade adequada, atendendo aos requisitos necessários para estudos de genotipagem de café e demonstrando potencial para aplicação em análises moleculares de amostras com elevado nível de degradação. Ainda foi possível concluir que a eficiência de reação pode ser observada após o uso da técnica de pré-amplificação.

Agradecimentos

Ao financiamento à pesquisa, desenvolvimento e inovação para a cafeicultura brasileira por meio da EMBRAPA/CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ.

REFERÊNCIAS

- ANVISA/MS **Resolução RDC nº 623 de 09 de março de 2022**. Dispõe sobre os limites de tolerância para matérias estranhas em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade. **DOU**, de 16 de março de 2022. Ed 51, Seção 1, pág. 119.
- BOLÍVAR-GONZÁLEZ, A. *et al.* SNP markers found in non-coding regions can distinguish among low-variant genotypes of Arabica and other coffee species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 70, n. 4, p. 1215–1228, abr., 2023.
- BURNS, D. T.; WALKER, M. J. Critical Review of Analytical and Bioanalytical Verification of the Authenticity of Coffee. **Journal of AOAC international**, v. 103, n. 2, p. 283–294, 1 abr., 2020.
- CARVALHO COUTO, C. *et al.* Adulteration in roasted coffee: a comprehensive systematic review of analytical detection approaches. **International Journal of Food Properties**, v. 26, n. 1, p.231–258, 22 set., 2023.
- COELLO, R. P *et al.* Comparison of three DNA extraction methods for the detection and quantification of GMO in ecuadorian manufactured food. **BMC Research Notes**, v.10, n. 1, p.1–7, 2017.
- DAIRAWAN, M.; SHETTY, P.J. The evolution of DNA extraction methods. **American Journal of Biomedical Science & Research**, v. 8, p. 39–46, 2020.
- FRANÇA, T.C. de O. *et al.* Desenvolvimento de método biomolecular para detecção e quantificação de arroz em amostras de café através do sistema *Taqman*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: o avanço da ciência no Brasil**. Vol. 3 – Cap. 12, p. 157 – 170, 2023. Editora Científica Digital. Disponível em: <https://www.editoracientifica.com.br/books/chapter/230212195>. Acesso em: 10 nov. 2025.

GOMES, M. de L. **Extração de DNA de Coffea arabica L.** Orientadora: Terezinha Aparecida Teixeira. 2019. 25 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

GUNNING, Y. *et al.* 16-O-methylcafesol is present in ground roast Arabica coffees: Implications for authenticity testing. **Food Chemistry**, v. 248, p. 52–60, mai., 2018.

HASSAN, R.M.F. *et al.* Guidelines for nucleic acid detection and analysis in hematological disorders. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 37, n. 2, p.165–73, 2015.

KAPP, J.R. *et al.* Variation in pre-PCR processing of FFPE samples leads to discrepancies in BRAF and EGFR mutation detection: a diagnostic RING trial. **Journal of Clinical Pathology**, v. 68, p.111-118, 2015.

LIU, P.F.; AVRAMOVA, L.V.; PARK, C. Revisiting absorbance at 230nm as a protein unfolding probe. **Analytical biochemistry**, v. 389, n. 2, p.165–70, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.03.028>

MANNINO, G.; KUNZ, R.; MAFFEI, M. E. Discrimination of Green Coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of Different Geographical Origin Based on Antioxidant Activity, High-Throughput Metabolomics, and DNA RFLP Fingerprinting. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1135, mai., 2023.

MARTELLOSI, C. *et al.* DNA Extraction and Analysis from Processed Coffee Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8432–8436, 1 nov., 2005.

MENDES, L. C. *et al.* Validação de método para determinação das impurezas cascas e paus em café torrado e moído. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, n. 0, 2016.

PEREZ, M. *et al.* Current strategies to guarantee the authenticity of coffee. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 539–554, 5 fev., 2021.

SAJIB, A. A.; BHUIYA, M. A. I.; HUQUE, R. A simple, efficient and rapid method for good quality DNA extraction from rice grains. **Rice Science**, v. 24, n. 2, p.119–122, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.09.003>

SANTOS, T. F. **Deteção de adulterantes em cafés comerciais brasileiros por PCR em tempo real.** Orientadora: Adriana Farah. 2013. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

SINGH, M. *et al.* Efficient DNA extraction procedures for processed food derivatives—a critical step to ensure quality for GMO analysis. **Food Analytical Methods**, v. 14 n. 11, p 2249–2261, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02051-y>

SPANIOLAS, S. *et al.* Authentication of Coffee by Means of PCR-RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p.7466–7470, 1 out., 2006.

TAN S.C.; YIAP B.C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. **Journal of biomedicine & biotechnology**, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1155/2009/5743982009>.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Poor PCR efficiency.** Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html>. Acesso em: 20 set. 2025.

TIBBITS, J.F.G. *et al.* A rapid method for tissue collection and high-throughput isolation of genomic DNA from mature trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 24, p. 81-91, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02914048>

TOCI, A. T. *et al.* Coffee Adulteration: More than two decades of research. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 83–92, 3 mar., 2016.

USMAN, T.; YU, Y.; LIU, C.; FAN, Z.; WANG, Y. Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. **Genet Mol Res.** 2014; 13(2):3319–28. Doi: <https://doi.org/10.4238/2014>

VAHDANI, M.; SAHARI, M.A.; TANAVAR, M. Quantitative and qualitative analysis of three DNA extraction methods from soybean, maize, and canola oils and investigation of the presence of genetically modified organisms (GMOs). **Food chemistry: Molecular sciences**, v. 8, 2024. Doi:10.1016/j.fochms.2024.100201

VERSMESSEN, N. *et al.* Comparison of DeNovix, NanoDrop and Qubit for DNA quantification and impurity detection of bacterial DNA extracts. **PLoS ONE**, v.19, n. 6, 2024. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305650>

WANG, X.; LIM, L.-T.; FU, Y. Review of analytical methods to detect adulteration in coffee. **Journal of AOAC international**, v. 103, n. 2, p. 295–305, 1 abr., 2020.

ZHAO, X. *et al.* A simple methodology for RNA isolation from bacteria by integration of formamide extraction and chitosan-modified silica purification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413 n. 26, p. 6469–6477, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03644-6>.