



Ferramentas Moleculares para garantir a qualidade de Alimentos produzidos à base de mamão

Edna Maria Morais Oliveira¹
Fernanda N. Peron²
Andrea Matos³
Natália Eudes Fagundes de Barros⁴
Marcos José de Oliveira Fonseca⁵
Otniel Freitas-Silva⁶

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de mamão (*Carica papaya*), ocupando a terceira colocação no mercado exportador mundial. A importância nutricional do mamão está associada à presença de altos teores de vitaminas A, além de também conter vitamina C, licopeno e fibras. Devido a sua qualidade nutricional, existe grande potencial para a utilização do mamão como matéria-prima em produtos industrializados. Diante disso, o uso de técnicas moleculares para detecção da presença de mamão, garantindo a qualidade e detectando possíveis fraudes, torna-se extremamente necessária. Diferente do que ocorre com a folha, a extração do DNA da polpa deve ser otimizada devido à presença de interferentes tais como proteínas e sais. O objetivo deste trabalho foi verificar a aplicabilidade da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar presença de mamão, utilizando três métodos de extração de DNA total da folha e polpa. Os parâmetros avaliados foram: a quantidade e a pureza do DNA extraído, e sua amplificabilidade. Os métodos empregados foram baseados em CTAB (CARDARELLI et al., 2005) (método 1), em CTAB contendo β -mercaptoetanol (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998) (método 2) e o *Kit comercial DNeasy* (método 3).

Os resultados obtidos indicaram que os três métodos testados foram eficientes no isolamento de DNA total. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria de ultravioleta a 260nm ($\mu\text{g}/100\text{mg}$) e a qualidade espectrofotométrica foi determinada pela razão entre as absorbâncias em 260nm e 280nm. Quanto à quantidade de DNA extraído, os métodos (1) e (2) apresentaram uma recuperação de (7,3 \pm 2,3) $\mu\text{g}/100$ mg, enquanto o método (3) (83,0 \pm 48,9) $\mu\text{g}/100\text{mg}$. Os *primers* para actina e papaína foram utilizados para verificar a amplificabilidade através da reação em cadeia da polimerase, produzindo *amplicons* de 374 e 51 pb, respectivamente. Os extratos obtidos das folhas e polpa apresentaram amplificação para os dois alvos. Já os produtos processados só apresentaram amplificação para a papaína, uma vez que o DNA desses produtos encontra-se num nível maior de degradação. Estes resultados evidenciaram que a PCR pode ser utilizada para a garantia da qualidade de alimentos processados contendo polpa (produto natural) de mamão.

Introdução

O mamão (*Carica papaya L.*), é uma fruta presente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de mamão,

¹Eng. Química, D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba. CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, edna@ctaa.embrapa.br

²Graduação, Universidade Federal do Espírito Santo, fernandaperon2003@yahoo.com.br

³Química, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba. CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, andreams@ctaa.embrapa.br

⁴Bolsista CAPES, D.Sc., Universidade de São Paulo, nataliaeudes@usp.br

⁵Eng. Agrônomo, D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba. CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, mfonseca@ctaa.embrapa.br

⁶Eng. Agrônomo, M.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba. CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, ofreitas@ctaa.embrapa.br

representando 30% do total produzido, e o terceiro exportador mundial, depois do México e da Malásia. Apesar da contínua tendência de crescimento da exportação, a fragilidade da fruta torna-se uma dificuldade para a comercialização. Diversas medidas de pós-colheita são utilizadas para a manutenção da qualidade do fruto, tanto pela redução da taxa metabólica como pela inibição do desenvolvimento de patógenos (COSTA; BALBINO, 2002). Todavia, a cultura do mamoeiro sofre diversos problemas fitossanitários e no Brasil, as viroses constituem o principal grupo de patógenos que causam doenças em mamão podendo infectar até 100% da lavoura em poucos meses (TAVARES et al., 2004). Uma alternativa para o controle dessas viroses foram as modificações genéticas que tornaram estes frutos mais resistentes, a exemplo do que foi realizado pela Universidade de Cornell (EUA) em colaboração com a Universidade do Havaí, que produziu os primeiros mamoeiros transgênicos resistentes ao vírus da mancha anelar PRSV - *Papaya ringspot virus* (GONSALVES, 1998; SOUZA JUNIOR, 1999). Entretanto, o consumo de mamão geneticamente modificado não é aceito em todos os países, o que reforça a necessidade de aumentar os esforços para garantir a produção e a qualidade de variedades convencionais.

A importância nutricional do mamão está associada à presença de altos teores de vitaminas A, além de também conter vitamina C, licopeno, ferro, cálcio e fibras que regularizam o trato digestivo. Estas características impulsionaram o mercado a investir nos produtos processados, aumentando o valor

agregado desta *commoditie*, além de garantir o acesso à fruta por consumidores de toda faixa etária através do consumo de bebidas lácteas, bebidas a base de soja, preparados de vitamina (farinhas), barra de cereais, alimentos infantis, iogurtes entre outros (LÓPEZ-MALO et al., 1994).

Diante deste cenário, este trabalho teve como objetivo implementar e avaliar três diferentes protocolos de extração de DNA genômico de produtos processados à base de mamão e posterior detecção do gene endógeno para o mamão (papaina), através da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), garantindo a presença de mamão.

Materiais e Métodos

Material

As amostras de folha e a polpa do mamão foram utilizadas como controle positivo de extração. Os produtos processados analisados foram adquiridos no mercado local, sendo uma unidade de papinha de frutas (alimento infantil) (A), bebida láctea (B) e iogurte (C). A polpa foi previamente seca em estufa por 24 horas a 40°C.

As amostras de DNA foram obtidas empregando-se os seguintes métodos: em CTAB (CARDARELLI et al., 2005) (método 1), em CTAB contendo β -mercaptoetanol (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998; ROMANO; BRASILEIRO, 2007) (método 2) e o *Kit comercial DNeasy* (método 3). A Tabela 1 apresenta a descrição dos protocolos.

Tabela 1. Descrição dos protocolos utilizados para extração de DNA genômico.

Protocolo	Tampão de Extração	Condição Empregada	Precipitação	Purificação	Solução Final
1	2%CTAB, 1,4M NaCl 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH 8)	75°C por 90 min (agitação a cada 15min)	0,5% CTAB, 0,04M NaCl + Isopropanol	Clorofórmio + NaCl 1,2M + Etanol 70%	50 μ l H ₂ O
2*	2%CTAB, 1,4M NaCl 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH 8), 0,2% β -mercaptoetanol	75°C por 60 min (agitação a cada 15min)	Isopropanol + KCOOH 3M	Etanol 70%	50 μ l TE
3	Tampão AP1(detergente) Proteinase K + Rnase AP2 (precipitação de debris)	65°C por 180min	Membrana em sílica gel + AP3	Membrana em sílica gel + Tampão AW	200 μ l AE

* Protocolo EMBRAPA modificado, onde a quantidade de amostra inicial passou de 3g para 100mg (Anexo1).

Análise por espectrofotometria de UV

A concentração dos extratos de DNA, de todas as amostras obtidos pelos métodos (1), (2) e (3), foi determinada por espectrofotometria de ultravioleta (BIORAD), em comprimento de onda igual a 260 nm (A_{260}) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Eletroforese em gel de agarose

Para a verificação da presença e integridade do DNA isolado, foi realizada a eletroforese em gel de agarose. Em microtubos foram adicionados 2,5 μ L de azul de bromofenol juntamente com 10 μ L de solução de DNA genômico. Em seguida as amostras foram aplicadas no gel de agarose 1,5% e a eletroforese foi conduzida sob 150V e 150mA por 90 min. Após a corrida, o gel foi fotodocumentado utilizando o equipamento VILBERT LOUMAT (Biosystems, Curitiba,PR).

Amplificabilidade do DNA isolado

As amostras de DNA foram utilizadas como template para a PCR, que teve como primers os do gene endógeno do mamão (papaína) e do gene para actina de produtos vegetais, cujos amplicons esperados são de 51pb e 374 pb, respectivamente. As condições de reação foram definidas pelo Kit PCR Mastermix (Invitrogen), onde foram adicionados 45 μ L do Mastermix, 1 μ L de cada primer e 3 μ L de DNA, com a ciclagem: 95 C/7min, 95 C/1min, 65 C/1min, 72 C/1min, 72 C/10min para a papaína com a temperatura de anelamento de 52 C.

Resultados e Discussão

A determinação da concentração do DNA total por espectrofotometria de UV só pôde ser concluída para os extratos de polpa e da folha, apresentando uma concentração média para ambos de (7,3 2,3) μ g/100 mg para os métodos (1) e (2), e de (83,0 \pm 48,9) μ g/100mg para o método (3). O alto erro verificado para as leituras do espectrofotômetro pode estar relacionado à falta de calibração deste equipamento (BioRad). A quantidade de DNA obtido dos produtos processados estava abaixo do limite de detecção do espectrofotômetro usado. Estes resultados mostram a importância da utilização de amostras-controle no desenvolvimento de metodologias, pois estes servem como indicadores na tomada de decisões.

Apesar da obtenção de DNA total de todos os métodos avaliados neste estudo, a visualização só foi possível após a amplificação do gene para a actina (FIGURA 1). Pode-se observar que, para os três métodos usados, a amplificação ocorreu apenas para as amostras de DNA isolados a partir de folha e polpa. A ausência de amplificação da actina para os produtos industrializados

deve-se ao fato de estes apresentarem DNA degradado pelo processamento utilizado, não sendo possível a síntese de um amplicon com 374 pb.

Para garantir a presença do mamão em todas as amostras, a PCR foi novamente conduzida utilizando como alvo a papaína, cujo amplicon esperado é de 51pb. A Figura 2 revela que a amplificação da papaína ocorreu para todas as amostras, inclusive nos produtos processados.

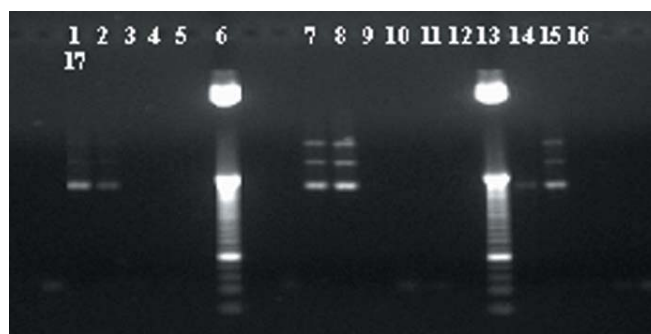


Fig. 1. Amplificação do gene para actina usando como *template* os extratos de DNA obtidos, a partir de polpa e folha, usando os métodos 3 (linha 1 e 2), método 1 (linha 7 e 8) e método 2 (linha 14 e 15). Padrão 25pb (linhas 6 e 13).

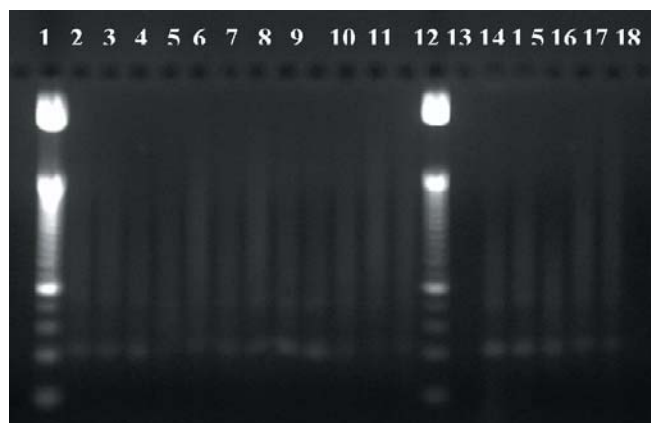


Fig. 2. Amplificação do gene para papaína usando como *template* todos os extratos de DNA obtidos, usando os métodos 1 (linhas 2 a 6), método 2 (linhas 7 a 11) e método 3 (linha 14 a 18). Padrão 25pb (linhas 1 e 12). Branco (linha 13)

Conclusão

Verificou-se que a adaptação do método CTAB com β -mercaptoetanol foi muito bem sucedida, representando um avanço na aplicação de técnicas moleculares para a análise de produtos processados, os quais apresentam baixos rendimentos em quantidade de DNA total extraído. Adicionalmente, esta metodologia poderá ser estendida à detecção e quantificação de variedades transgênicas, atendendo à legislação de rotulagem dos países importadores e certificando a ausência de produtos geneticamente modificados que sejam alvos de

barreiras técnicas. Além disso, com a utilização desta metodologia será possível calcular a percentagem de polpa de mamão no produto industrializado, utilizando como referência o gene da actina na quantificação relativa através de PCR em tempo real.

Referências Bibliográficas

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 309 p.

CARDARELLI, P.; BRANQUINHO, M. R.; FERREIRA, R. T. B.; CRUZ, F. P. da; GEMAL, A. L. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**, v. 16, n. 10, p. 859-866, 2005.

COSTA, A. de F. S. da; BALBINO, J. M. de S. Características da fruta para exportação e normas de qualidade. In: FOLEGATTI, M. I. da S.; MATSUURA, F. C. A. U. (Ed.). **Mamão: pós-colheita**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 12-18. (Frutas do Brasil, 21).

GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 415-437, set. 1998.

LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; WELTI, J.; CORTE, P.; ARGALIZ, A. Shelf-stable high moisture papaya minimally processed by combined methods. **Food Research International**, v. 27, n. 6, p. 545-553, 1994.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA em plantas: solução para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 9, p. 40-43, 1999. Disponível em: <<http://uefs.br/disciplinas/bot859/extra.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SOUZA JÚNIOR, M. T. **Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV. Brazil. Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil**. 1999. 322 f. Dissertation (Ph.D.) - Cornell University, Ithaca, 1999.

TAVARES, E. T.; TATAGIBAZ, J. S.; VENTURA, J. A.; SOUZA JÚNIOR, M. T. Dois novos sistemas de diagnose precoce de meleira do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 563-566, 2004.

Anexo

Detalhamento do método 2 - CTAB com β -mercaptoetanol.

Extração de DNA Genômico pelo Método CTAB

Modificado por Fernanda Nunes Peron

1. Em microtubo de 2 mL, pesar 100mg de polpa seca em estufa a 40°C;
2. Adicionar 0,8 mL de tampão CTAB (2%CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH 8), 0,2% β -mercaptoetanol) pré-aquecido a 75°C;
3. Incubados nessa temperatura por 30 min, agitar a cada 10min em vórtex;
4. Adicionar 1V de clorofórmio seguido de homogeneização com o auxílio de um agitador, por 1 min;
5. Centrifugar por 10 min a 13.000 rpm;
6. Transferir a fase aquosa (fase superior) para um tubo novo;
7. Adicionar 1 volume de clorofórmio novamente;
8. Centrifugar por 10min a 13.000rpm;
9. Transferir a fase aquosa (superior) para um novo tubo;
10. Adicionar 0,6 volume de isopropanol gelado e misturar suavemente por inversão do tubo, várias vezes;
11. Centrifugar a amostra por 20 minutos, a 13.000rpm e descartar o sobrenadante;
12. Lavar o precipitado com aproximadamente 1 mL de etanol 70%.
13. Centrifugar por 5min a 13.000rpm.
14. Secar o precipitado, deixando tubo invertido em papel-toalha ou em câmara de fluxo laminar;
15. Dissolver o precipitado em 50 μ L de TE e incubar a 4°C, por meia hora ou mais.

Previsão de duração: 3h

Comunicado Técnico, 130

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: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2008): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta.*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteadó Stephan, RenataTorrezan, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, Nilvanete Reis Lima e André Luis do Nascimento Gomes.*
Secretária: *Renata Maria Avilla Paldês*
Revisão de texto: *Comitê de Publicações.*
Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo.*
Editoração eletrônica: *André Guimarães de Souza*

Expediente