

Uso de PCR em Tempo Real como Ferramenta para Garantir a Autenticidade de Alimentos Processados à Base de Mamão (*Carica papaya*)

Edna Maria Morais Oliveira¹
Andrea Matos²
Roberta Manhães da Silva³

Introdução

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), da família Caricaceae, é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É originário da América Tropical, entre o noroeste da América do Sul e o Sul do México. O Brasil é o maior produtor mundial desta fruta, com produção de um milhão e 890 mil toneladas no ano de 2007, segundo dados da FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2007). Isto representa 27% da produção do mundo neste ano. Embora seja o maior exportador mundial de mamão, seguido pelo México, o Brasil exporta mais mamão do grupo Solo, enquanto o México produz mais do grupo Formosa. Para aumentar a disponibilidade e o consumo, muitos produtos processados à base de mamão têm sido desenvolvidos como barras de cereal, iogurtes, bebidas lácteas,

bebidas de soja, entre outros (LÓPEZ-MALO et al., 1994). O mesocarpo do mamão, a polpa, é a parte da fruta utilizada nos produtos processados. Sendo assim, o uso de técnicas moleculares torna-se uma importante ferramenta para a detecção da presença de mamão nesses produtos, contribuindo para o controle da qualidade e a autenticidade de tais produtos. Para tanto, o gene endógeno do mamão que codifica a papaína, pode ser usado como marcador molecular para garantir a presença de mamão na composição de tais produtos.

Assim, objetivo deste trabalho foi verificar a presença de mamão em produtos industrializados por detecção e quantificação do gene para papaína, um gene endógeno e específico para mamão. Tais determinações foram conduzidas por PCR convencional e em tempo real, usando o sistema SYBR Green para a quantificação (PCR em tempo real).

¹Engenheira Química, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, edna@ctaa.embrapa.br

²Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, andreams@ctaa.embrapa.br

³Nutricionista, M.Sc. em Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, betanutry@gmail.com

Material e Métodos

Amostras

Amostras de polpa de mamão foram obtidas pelo despulpamento de frutos inteiros e usadas para a construção da curva padrão. Os frutos e os produtos processados foram adquiridos em mercados locais (mamão, iogurte, alimento infantil e bebida láctea).

Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico de todas as amostras foi isolado usando 50 mg de cada amostra, seguindo o protocolo do kit comercial *Dneasy* (Quiagen). As amostras foram homogeneizadas em blender (Poli Skymesen) antes do procedimento de extração. O DNA genômico foi quantificado por espectrometria a 260nm (Biorad-*Spectrophotometer*).

Desenho de primers

Os primers, sintetizados pela MWG Biotech, foram desenhados usando o *Software Primer Express 1.2* for Macintosh, e as seqüências do gene para papaína depositadas no GenBank (Acesso K00821 e M30884).

PCR quantitativo

Para determinação do conteúdo de mamão nas amostras de produtos processados, foram conduzidas PCR em tempo real no equipamento ABI7000 SDS (Applied Biosystems), cujas condições foram estabelecidas como: 10 mL de 1x TaqMan Universal Mastermix (Applied Biosystems), 2 mL de cada primer (2.5 nmol/L), 1 mL de 20x SYBR GREEN e 5 mL de DNA, com volume final de 20mL. As condições de termociclagem foram as seguintes: 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15s e 65°C por 1 min, acrescido de uma etapa para construção da curva de dissociação. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Resultados e Discussão

O isolamento do DNA foi uma etapa bem sucedida para todas as amostras, embora algumas das amostras de DNA não tenham sido visualizadas no gel de agarose. Isso se deve ao alto grau de processamento dos alimentos e, portanto, alta degradabilidade e baixa concentração do DNA. Em experimentos anteriores (PERON et al., 2007), foi possível mostrar a amplificabilidade do DNA isolado, mesmo em baixas concentrações e com alto grau de desnaturação, através da condução de PCR qualitativo.

A curva padrão construída com amostras obtidas por diluição seriada do DNA isolado da polpa de mamão estão apresentada na Figura 1. O PCR quantitativo foi conduzido usando o gene para papaína ("house-keeping gene"). A inclinação e o coeficiente de correlação da retas obtidas foi de -3,83 e 0,97, respectivamente.

Esses resultados foram obtidos com um material comum, pois não há material certificado ou de referência para a grande maioria dos vegetais, que não estão relacionados a produtos geneticamente modificados.

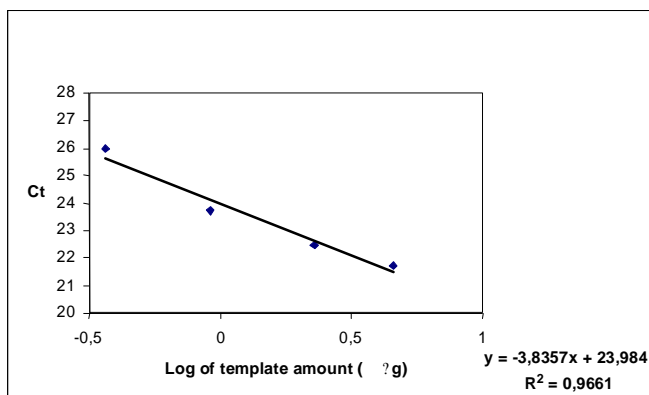


Figura 1. Eficiência da PCR quantitativa usando DNA isolado da polpa de mamão.

Assim sendo, estes dados podem ser considerados promissores. A concentração mais alta de papaína usada para quantificação desses produtos também contribuiu para um R^2 baixo, como conseqüência da menor eficiência da reação. Isso porque os primers encontram mais dificuldade em se ligar às seqüências específicas, diminuindo a ação da enzima (Taq DNA polimerase) na amplificação. A eficiência da PCR quantitativa (em tempo real) foi de 82,27 %, o Limite da Detecção (LOD) foi de 3.6 e o Limite da Quantificação (LOQ) foi igual a 12. Quando esses valores são comparados com o estabelecido em protocolos de validação na análise de OGM (BARROS; OLIVEIRA; MARIN, 2008; CANKAR et al., 2006; EUROPEAN COMMISSION, 2007), fica evidente que essa ferramenta molecular tem potencial de aplicação para o controle de qualidade na indústria de alimentos.

Apesar da detecção de mamão em todas as amostras (Tabela 1), a quantificação não foi muito acurada, devido à quantificação abaixo do LOQ. Assim, os resultados foram estimados como sendo menores que 1,3%.

Tabela 1. Quantidade de DNA de mamão nos produtos processados.

PRODUTO	MAMÃO
logurte	>1.3%
Alimento infantil	>1.3%
Bebida Láctea*	>LOD

*O LOD do método quando expresso em massa/quantidade é de 0,8 pg.

As curvas de dissociação indicaram que as condições da PCR em tempo real devem ser otimizadas para reduzir a formação de dímeros de *primers* (Figura 2). Esta avaliação é muito importante, pois estes ensaios foram realizados para a obtenção de um produto de PCR pequeno para permitir a detecção. Contudo, houve uma redução na sensibilidade, o que é interessante para conduzir a reação em condições ótimas. Para todas as amplificações, a temperatura de *melting* (T_m) dos produtos da PCR foi de 77°C, e o desvio padrão foi igual a zero, mostrando a alta especificidade dos *primers* usados

Esses resultados confirmam a aplicabilidade de métodos baseados na técnica PCR para garantir a autenticidade e a qualidade dos produtos a base de mamão, permitindo avaliar se os produtos atendem às determinações da legislação de rotulagem e aos direitos de consumidores.

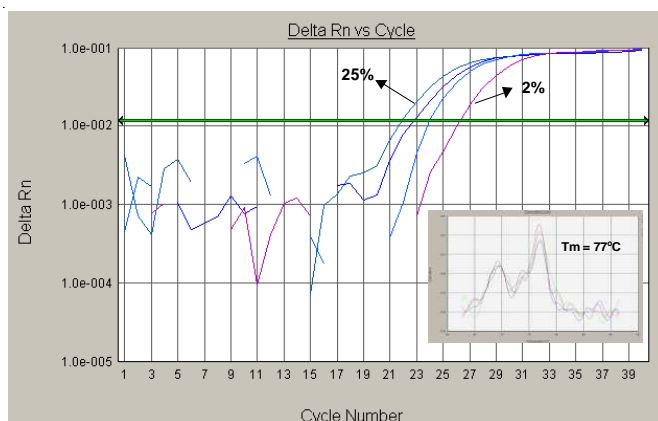


Figura 2. Amplificação e curva de dissociação das amostras de DNA isoladas de produtos a base de mamão.

Referências

BARROS, N. E. F. de; OLIVEIRA, E. M. M.; MARIN, V. A. Applicability of the real-time polymerase chain reaction based-methods in quantification of genetically modified organisms in foods. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 85-92, jan./feb. 2008.

CANKAR, K.; ŠTEBIH, D.; DREO, T.; ZEL, J.; GRUDEN, K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BMC Biotechnology**, Londres, v. 6, p. 37, 2006.

EUROPEAN COMMISSION. Joint Research Centre. **Event-specific method for the quantification of soybean line A2704-12 using real-time PCR**. 2007. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/A2704-12_soybean_validated_Method.pdf>. Acesso em: 15 out. 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. 2007. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 15 out. 2009.

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

PERON, F. N.; MATOS, A.; OLIVEIRA, E. M. M.; BARROS, N. E. F.; BATICUCCI, M. C. P.; FONSECA, M. J. O.; FREITAS-SILVA, O. Uso de ferramentas moleculares para garantia da qualidade de alimentos produzidos à base de mamão. **Alimentos Ciencia e Ingeniería**, v. 16, n. 3, 2007. p. 25-26. Edição dos trabalhos aceptados para su presentación en VI Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos, Ambato, Equador, nov. 2007.

Comunicado Técnico, 148

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 (2009): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteadó Stephan, Renata Torrezan, Ronoel Luiz de O. Godoy, Nilvanete Reis Lima e André Luis do Nascimento Gomes*

Expediente

Secretária: *Michele Belas Coutinho*
Supervisor editorial: *Comitê de Publicações*
Revisão de texto: *Edmar das Mercês Penha*
Normatização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*
Editoração eletrônica: *André Luis do N. Gomes e Marcos Moulin*