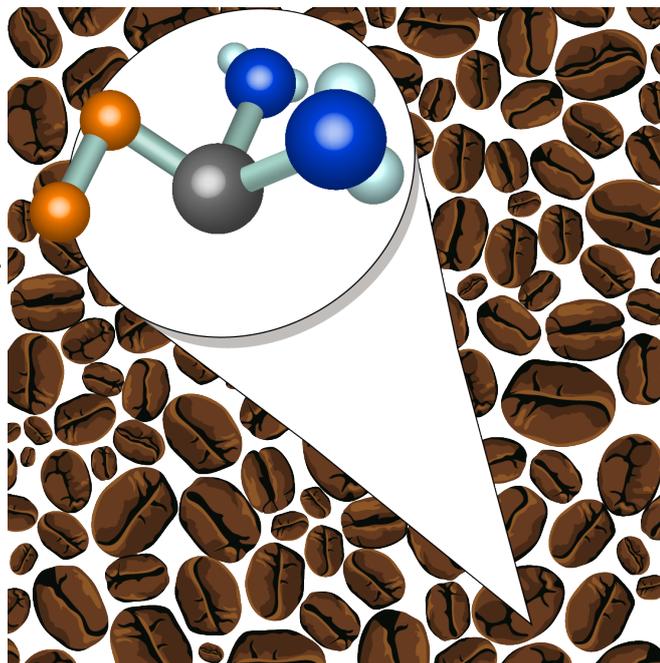


### Definição de um Marcador Molecular para a Detecção de Milho em Café Comercial Usando PCR em Tempo Real

Edna Maria Morais Oliveira<sup>1</sup>  
Thiago Ferreira dos Santos<sup>2</sup>  
Tatiane Corrêa de Oliveira<sup>3</sup>  
Ivanilda Santos de Lima<sup>4</sup>  
Felipe Vitório Ribeiro<sup>5</sup>  
Adriana Farah de Miranda Pereira<sup>6</sup>

Ilustração: Gabriel Gomes De Sousa



#### Introdução

O café torrado e moído é um produto de consumo bastante vulnerável à adulteração, uma vez que apresenta características físicas (tamanho de partícula, textura e cor) que são facilmente reproduzidos por torra e a moagem de uma variedade de materiais biológicos como cereais, raízes, cascas e etc. (OLIVEIRA et al., 2009).

Embora alguns estudos recentes tivessem estabelecido parâmetros adequados e marcadores para a detecção de adulterantes em café torrado e moído e café instantâneo ou solúvel, a maioria das metodologias desenvolvidas são com base em métodos cromatográficos (GARCIA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; PAULI; CRISTIANO; NIXDORF, 2011). Entretanto, por mais que sejam eficazes, tais metodologias são laboriosas, dispendiosas, e, portanto, não são apropriadas para análises de rotina (REIS; FRANCA; OLIVEIRA, 2013). Segundo Jham et al. (2007) o milho é considerado o adulterante mais comumente encontrado no café brasileiro.

Uma vertente com grande potencial de utilização a ser seguida é a da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR- *polymerase chain reaction*) como ferramenta em investigação sobre fraudes em café e seus subprodutos, através da utilização de marcadores de DNA (sequencia-alvo) (CANKAR et al., 2008). Os diferentes marcadores de DNA diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar, quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, reprodutibilidade e repetibilidade. Uma vez que é possível obter sequências genômicas específicas para cada matriz utilizada como adulterante no café, é possível identificá-las em amostras comerciais de interesse. O gene que codifica a zeína, uma proteína de reserva específica do milho, já foi validado por Germini et al. (2004) como endógeno (*taxon gene*) para esta matriz.

No presente trabalho, identificou-se um novo par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para zeína, com um amplicon de 100 pb, com o objetivo de aumentar a sensibilidade da detecção e quantificação de DNA de milho. Para tanto, foi construída uma

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

<sup>2</sup> Biólogo, bolsista do CNPq-Brasil, mestrando da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, thfsctaa@gmail.com

<sup>3</sup> Técnica em Alimentos, assistente da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, tatiane.correa@embrapa.br

<sup>4</sup> Nutricionista, bolsista do CNPq-Brasil, Rio de Janeiro, RJ, ivanildalima@gmail.com

<sup>5</sup> Graduando em Química Industrial, bolsista do CNPq-Brasil, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, vitorioch@gmail.com

<sup>6</sup> Nutricionista, D.Sc. em Ciências de Alimentos, professora adjunta da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, afarah@iq.ufrj.br

curva-padrão para a determinação de parâmetros de desempenho e posterior validação do método de detecção de milho torrado em café torrado e moído, usando a técnica PCR em tempo real.

## Material e Métodos

### Amostras

As amostras comerciais de café torrado e moído e café solúvel de diferentes marcas, bem como o milho *in natura*, foram adquiridas em mercado local do município do Rio de Janeiro - RJ. Foram utilizadas amostras de café torrado e moído padrões, livre de contaminantes, cedidas pelo Núcleo de Pesquisa em Café Prof. Luiz Carlos Trugo - Instituto de Nutrição/ UFRJ.

### Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico foi isolado usando 300 mg de cada amostra, seguindo o protocolo CTAB modificado com adição de 1% β-Mercaptoetanol. O DNA genômico das amostras *in natura* foi isolado com o kit comercial *Dneasy*<sup>®</sup> (Quiagen). O rendimento das extrações e a qualidade/pureza foram avaliados pela determinação da absorbância por espectrometria a 260 nm e pela razão das absorbâncias a 260 nm e 280 nm (Shimadzu UV-1800 UV-VIS spectrophotometer), respectivamente.

### Desenho de primers

A sequência utilizada como molde para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foi a do gene que codifica a zeína, com número de acesso no GeneBank (NCBI): M60837.1. Os *primers* foram definidos e desenhados através do *software* livre *on line*, GeneFisher2, após análises de bioinformática seguindo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2011). Subsequentemente, os mesmos foram sintetizados pela Eurofins MWG Operon MWG Biotech.

### PCR quantitativo

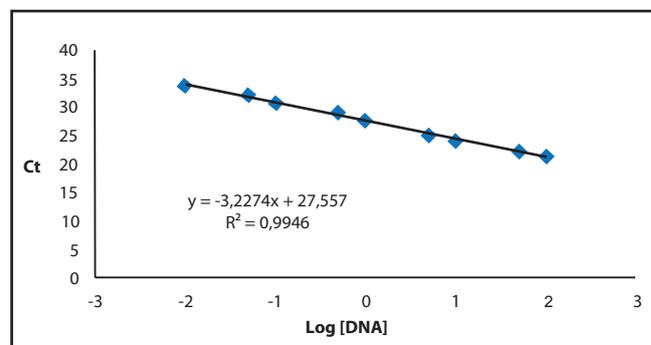
Para detecção do milho em café torrado e moído e café solúvel, foram conduzidas PCR em tempo real no equipamento SDS ABI7000 (Applied Biosystems), cujas condições da reação foram estabelecidas como: 12,5 µL de 2x Master Mix SYBR GREEN (Applied Biosystems), 0,6 µL de cada *primer* (0,3 µM), 6,3 µL de água MilliQ e 50 ng de DNA inicial. As condições de termociclagem foram as seguintes: 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, acrescido de uma etapa para construção da curva de dissociação. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

## Resultados e Discussão

O isolamento do DNA foi uma etapa bem sucedida para todas as amostras, embora as amostras de DNA genômico de café torrado e moído não tenham sido visualizadas no gel de agarose. Isso se deve ao alto grau de processamento e interações químicas de contaminantes com o agente corante (MARTELLOSI et al., 2005). Em experimentos prévios, foi possível confirmar a capacidade de amplificação do DNA isolado, mesmo em baixas concentrações, através da condução de PCR qualitativo.

A curva padrão construída com as amostras, obtida por diluição seriada do DNA isolado do milho *in natura*, está apresentada na Figura 1. A PCR quantitativa foi conduzida usando o gene da zeína. A inclinação e o coeficiente de correlação da reta foram de -3,2274 e 0,9946, respectivamente.

A eficiência da PCR quantitativa (em tempo real) foi de 95%, o Limite da Detecção (LOD) = 0,33 pg. Quando esses valores são comparados com o estabelecido em protocolos de validação de análises de detecção/quantificação de sequências específicas de DNA (BARROS; OLIVEIRA; MARIN, 2008; CANKAR et al., 2006; EUROPEAN COMMISSION, 2007), fica evidente que o uso dessa ferramenta molecular tem potencial de aplicação para o controle de qualidade na indústria do café.



**Figura 1.** Curva padrão para cálculo da eficiência da PCR quantitativa usando DNA isolado da zeína do milho *in natura*.

Foi detectado DNA da zeína do milho em todas as amostras, conforme pode ser verificado na Tabela 1. Apesar da detecção de milho em todas as amostras, a quantificação deste adulterante foi conduzida através de uma estimativa com relação entre o peso/quantidade de DNA genômico extraído, pelos motivos supracitados.

**Tabela 1.** Detecção e quantificação do DNA da zeína de milho em amostras de café.

Amostra	Média Ct's	Desv Pad	% de DNA
A	30,65	0,278	0,110
B	32,47	0,383	0,030
C	32,31	1,279	0,034
D	31,59	0,249	0,056

As curvas de dissociação demonstram que as condições da PCR em tempo real estão suficientemente otimizadas. Para todas as amplificações, a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) dos produtos da PCR (*amplicon*) foi de 79°C, e o desvio padrão foi muito baixo, mostrando a alta especificidade dos *primers* usados.

Experimentos realizados usando soluções de DNA de cafés *gourmet* não apresentaram amplificação para milho.

## Conclusão

Os resultados confirmaram a aplicabilidade da metodologia baseada na técnica PCR, a qual pode garantir a autenticidade e a qualidade do café torrado e moído, bem como no café solúvel comercializados, permitindo identificar o gene que codifica a zeína e em consequência avaliar se os produtos foram adulterados com milho e se atendem às determinações da legislação de rotulagem e aos direitos do consumidor.

## Referências

- BARROS, N. E. F. de; OLIVEIRA, E. M. M.; MARIN, V. A. Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 85-92, jan./fev. 2008.
- CANKAR, K.; CHAUVENSY-ANCEL, V.; FORTABAT, M.-N.; GRUDEN, K.; KOBILINSKY, A.; ZEL, J.; BERTHEAU, Y. Detection of nonauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction: application to 35S in maize. **Analytical Biochemistry**, v. 376, n. 2, p. 189-199, May 2008.
- CANKAR, K.; ŠTEBIH, D.; DREO, T.; ŽEL, 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, n. 37, p. 1-15, Aug. 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://bookshop.europa.eu/en/event-specific-method-for-the-quantification-of-soybean-line-a2704-12-using-real-time-pcr-pbLBNA22910/downloads/LB-NA-22910-EN-C/LBNA22910ENC\\_002.pdf?FileName=LBNA22910ENC\\_002.pdf&SKU=LBN A22910ENCPDF&CatalogueNumber=LB-NA-22910-EN-C](http://bookshop.europa.eu/en/event-specific-method-for-the-quantification-of-soybean-line-a2704-12-using-real-time-pcr-pbLBNA22910/downloads/LB-NA-22910-EN-C/LBNA22910ENC_002.pdf?FileName=LBNA22910ENC_002.pdf&SKU=LBN A22910ENCPDF&CatalogueNumber=LB-NA-22910-EN-C)>. Acesso em: 20 dez. 2012.
- GARCIA, L. M. Z.; PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; CAMARA, C. A. P. da; SCARMINIO, I. S.; NIXDORF, S. L. Chemometric evaluation of adulteration profile in coffee due to corn and husk by determining carbohydrates using HPAEC-PAD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 9, p. 825-832, Oct. 2009.
- GERMINI, A.; ZANETTI, A.; SALATI, C.; ROSSI, S.; FORRÉ, C.; SCHMID, S.; MARCHELLI, R. Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3275-3280, May 2004.
- JHAM, G. N.; WINKLER, J. K.; BERHOW, M. A.; VAUGHN, S. F.  $\gamma$ -Tocopherol as a marker of brazilian coffee (*Coffea arabica* L.) adulteration by corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 5995-5999, Jul. 2007.
- MARTELLOSI, C.; TAYLOR, E. J.; LEE, D.; GRAZIOSI, G.; DONINI, P. DNA extraction and analysis from processed coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8432-8436, Nov. 2005.
- OLIVEIRA, E. M. M.; OLIVEIRA, T. C. de; LIMA, I. S. de; FERREIRA, T. **Utilização de ferramentas de bioinformática na construção de primers para detecção de sequências específicas de DNA**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Documentos, 114).
- OLIVEIRA, R. C. S.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S.; AUGUSTI, R. Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 3, p. 257-261, May 2009.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 689-694, 2011.

REIS, N.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 715-722, Mar. 2013.

## Comunicado Técnico, 186

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) 3622-9713

**Home Page:** <http://www.ctaa.embrapa.br>

**E-mail:** [ctaa.sac@embrapa.br](mailto:ctaa.sac@embrapa.br)

**1ª edição**

1ª impressão (2013): tiragem (20 exemplares)

## Comitê de Publicações

**Presidente:** Virgínia Martins da Matta

**Membros:** André Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Leda Maria Fortes Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteadó Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Torrezan

## Expediente

**Supervisão editorial:** Daniela De Grandi C. Freitas

**Revisão de texto:** Janine Passos Lima da Silva

**Normalização bibliográfica:** Luciana S. de Araújo

**Editoração eletrônica:** André Luis do Nascimento Gomes, Gabriel Gomes de Sousa e Marcos Moulin