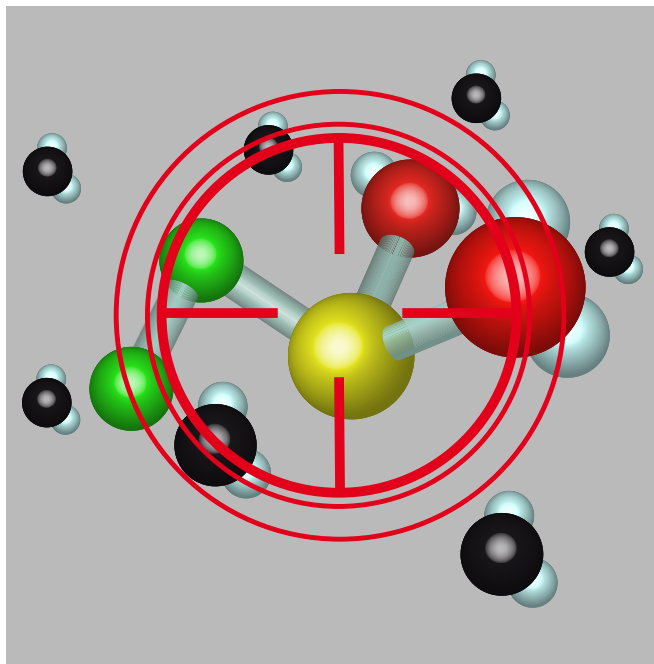


Ilustração: Gabriel Gomes de Sousa



## Definição de um Marcador Molecular para a Detecção de Cevada 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>

### Introdução

O Brasil é o principal exportador mundial de café e no período compreendido entre Novembro/2010 e Outubro/2011, a ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café) registrou o consumo de 19,72 milhões de sacas, representando um acréscimo de 3,11% em relação ao período anterior correspondente (Nov/09 a Out/10), que havia sido de 19,13 milhões de sacas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2011). Devido à grande produção e comercialização, produtos de café tem sido alvo da adição de adulterantes de menor valor econômico, como a cevada. Diante deste cenário, a análise e garantia da qualidade do café comercializado no país vem sendo o foco de grandes esforços por parte de órgãos de pesquisa, indústria e entidades fiscalizadoras (OLIVEIRA et al., 2009).

Assim, fica evidente a necessidade de implantação de um método eficiente e sensível para detecção de fraudes. 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). 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.

No presente trabalho, foi consultado o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) e um gene do cloroplasto de *Hordeum vulgare* (cevada) foi avaliado quanto à possibilidade de o mesmo ser considerado como um marcador molecular para a cevada, seguindo as orientações de Oliveira e colaboradores (2011).

<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

## Material e Métodos

### Amostras

As amostras comerciais de café torrado e moído e café solúvel de diferentes marcas foram adquiridas no mercado local. 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. As amostras de cevada, torrada e moída e *in natura*, foram adquiridas no mercado local.

### 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% de  $\beta$ -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 o citocromo F dos cloroplastos da cevada, com número de acesso no GeneBank (NCBI): NC\_008590.1. Os *primers* foram definidos e desenhados por meio do *software* livre *on line*, GeneFisher2, após análises de bioinformática, seguindo as orientações de Oliveira e colaboradores (2011). Subsequentemente, os mesmos foram sintetizados pela Eurofins MWG Operon MWG Biotech.

### PCR quantitativo

Para detecção da cevada em café torrado e moído e café solúvel foram conduzidas PCR em tempo real no equipamento ABI7000 SDS (Applied Biosystems), cujas condições da reação foram estabelecidas como: 12,5  $\mu$ L de 2x Master Mix SYBR GREEN (Applied Biosystems), 0,6  $\mu$ L de cada primer (0,3  $\mu$ M), 6,3  $\mu$ L 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 amplificabilidade do DNA isolado, mesmo em baixas concentrações, através da condução de PCR qualitativo.

A curva padrão construída com as amostras obtidas por diluição seriada do DNA isolado da folha e semente de café está apresentada na Figura 1A. A PCR quantitativa foi conduzida usando o gene para o cloroplasto citocromo F da cevada, e a curva padrão está apresentada na Figura 1B. Os experimentos foram realizados usando cevada *in natura*, pois não há material certificado ou de referência para esse vegetal.

A eficiência da PCR quantitativa (em tempo real) foi de 95%, o Limite da Detecção (LOD) = 0,326 pg de DNA de cevada. 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.

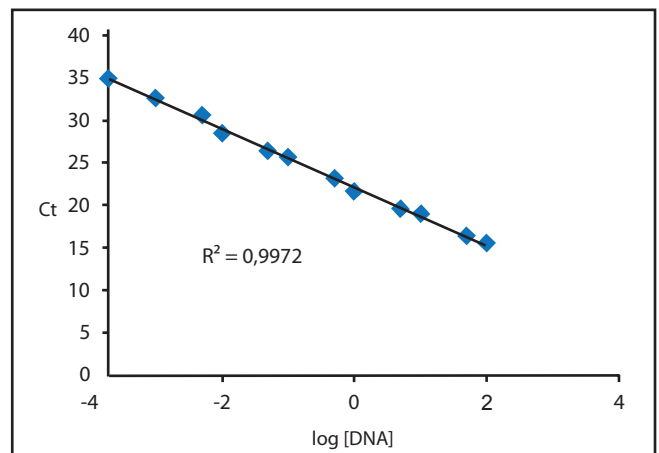


Figura 1A. Eficiência da PCR quantitativa usando DNA isolado de café *in natura*.

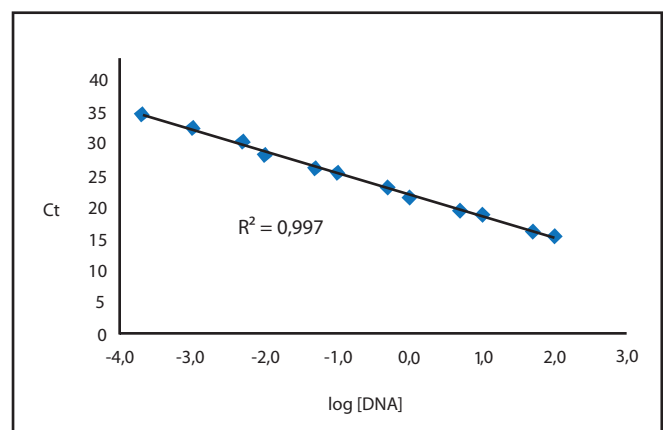


Figura 1B. Eficiência da PCR quantitativa usando DNA isolado de cevada *in natura*.

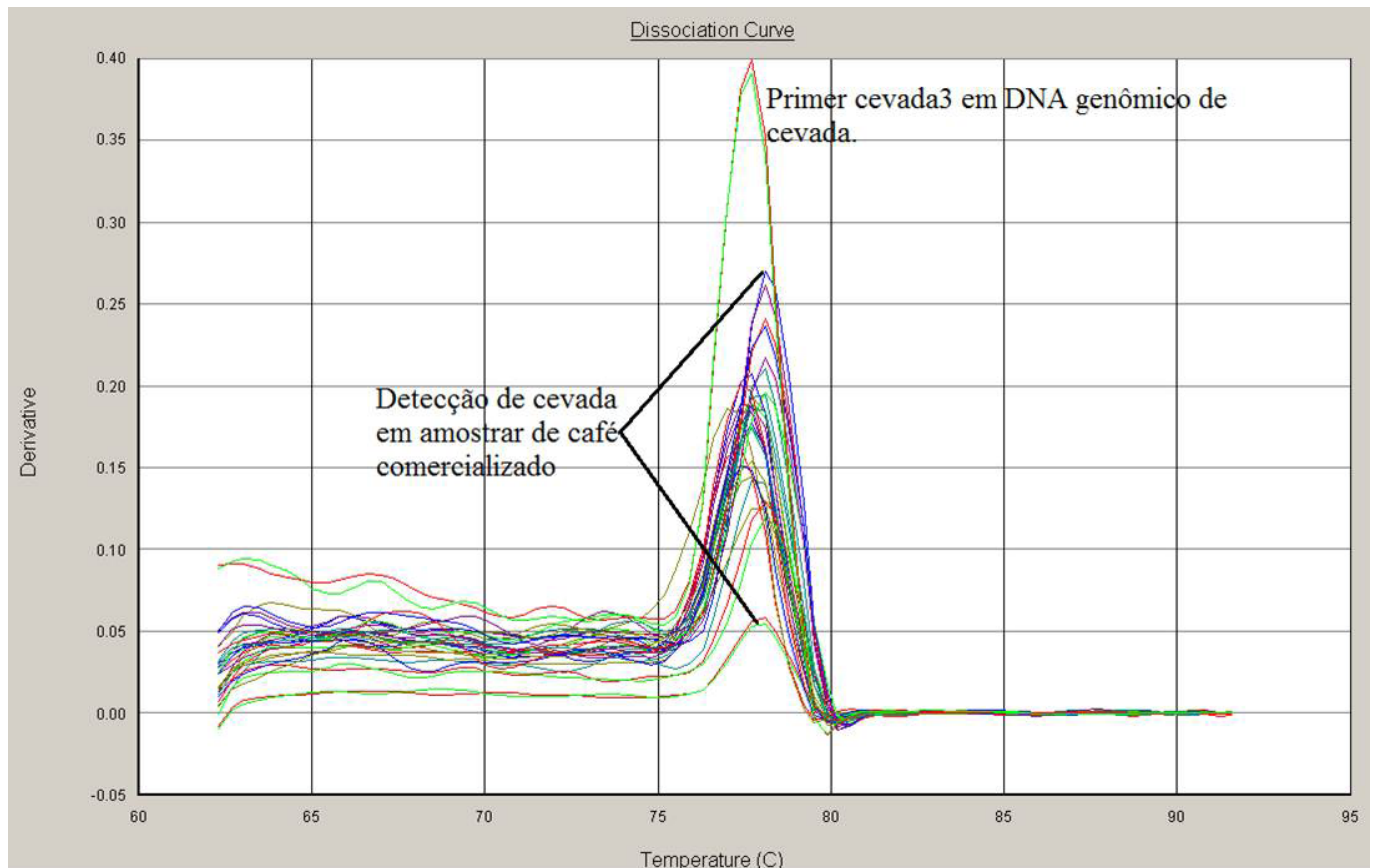


Figura 2. Amplificação e curva de dissociação das amostras de DNA isoladas de café torrado e moído.

As amostras comerciais foram analisadas para a presença de DNA de cevada. As curvas de dissociação (Figura 2) demonstram que as condições da PCR em tempo real estão suficientemente otimizadas. Esta avaliação é muito importante, pois estes ensaios foram realizados para a obtenção de um produto de PCR pequeno para permitir a detecção. Para todas as amplificações, a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) dos produtos da PCR foi de 77,8 °C, e o desvio padrão foi igual a zero, mostrando a alta especificidade dos *primers* usados.

## Conclusão

Esses resultados confirmam a aplicabilidade de métodos baseados na técnica PCR para garantir a ausência de cevada em café torrado e moído, permitindo avaliar se os produtos atendem às determinações da legislação de rotulagem e assegurando a qualidade do produto aos consumidores.

## Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Indicadores da indústria de café no Brasil – 2011**: o aumento do consumo em 2011. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#1389>>. Acesso em: 2 jul. 2012.
- 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=LBNA22910ENC\\_PDF&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=LBNA22910ENC_PDF&CatalogueNumber=LB-NA-22910-EN-C)>. Acesso em: 20 dez. 2012.

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.

## Comunicado Técnico, 189

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 Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Torrezan

## Expediente

**Supervisão editorial:** Daniela De Grandi C. Freitas  
**Revisão de texto:** Renata Valeriano Tonon  
**Normalização bibliográfica:** Luciana S. de Araújo  
**Editoração eletrônica:** André Luis do N. Gomes, Gabriel Gomes de Sousa e Marcos Moulin