



Abordagem Química na Extração de DNA de Tomate

Renata de Lima e Leonardo Fernandes Fraceto

Neste artigo, é apresentado um experimento simples: a extração de DNA de tomates utilizando procedimentos laboratoriais de fácil execução e reagentes de baixo custo. Trata-se de um tema atual a partir do qual se pode trabalhar uma série de conceitos químicos e bioquímicos fundamentais.

► processos de extração, DNA, tomate ◀

Recebido em 21/8/06; aceito em 19/3/07

Atualmente, o homem é capaz de manipular o material genético (engenharia genética) de tal forma que torna possível a produção de organismos geneticamente modificados (transgênicos). A tentativa está em se obter um organismo de melhor qualidade ou com característica de interesse antes não presente.

Isso é possível porque o material genético responsável pela hereditariedade é também responsável pela produção de proteínas de um organismo - proteínas essas que, por sua vez, serão responsáveis direta ou indiretamente pelas características observadas no "ser vivo".

Para atingir esse avançado desenvolvimento biotecnológico, foi necessário conhecer não apenas o genoma, mas a estrutura do material genético, possibilitando assim a escolha do gene de interesse e o seu isolamento. Isso faz da extração do material genético uma atividade básica de extrema importância para o seu próprio estudo.

O estudo da composição do material genético dos seres vivos teve início ainda no século XIX com as descobertas de Friedrich Miescher em 1869. A partir do pus humano e do esperma de salmão, o bioquímico

suíço isolou uma substância com alto teor de fosfato, a qual denominou nucleína, pois se encontrava no interior do núcleo celular. Dando continuidade aos seus estudos, Miescher separou depois a nucleína em substâncias protéicas e em substâncias ácidas, vindo daí a denominação ácido nucléico.

Posteriormente, o russo Phoebus A.T. Levene e seus colaboradores iniciaram o estudo das substâncias descobertas por Miescher. Contudo, acreditavam que era a parte protéica a responsável pela hereditariedade. Esse equívoco levou décadas para ser esclarecido até que, em meados de 1928, o médico bacteriologista inglês Frederick Griffith descobriu que uma determinada substância ainda não identificada era capaz de passar de células bacterianas mortas para células vivas. Finalmente, em 1944, o canadense Oswald T. Avery e seus colaboradores mostraram claramente o que era DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico), inaugurando assim a ciência denominada de Genética Molecular.

O estudo da estrutura do DNA propriamente dita iniciou-se com Erwin Chargaff, que determinou as proporções entre as bases nitrogenadas. No entanto, a estrutura dessa molécula

mostrava-se ainda demasiadamente complexa e extraordinária.

Antes de terminar a primeira metade do século XX, baseados em experimentos anteriores de Maurice Wilkins e Rosalind Franklin sobre a difração de raios X das fibras de DNA, Watson e Crick concluíram que o ácido desoxirribonucléico (DNA) era composto por nucleotídeos que tinham uma estrutura básica, com três tipos de componentes químicos: (1) fosfato; (2) desoxirribose, um açúcar classificado como uma pentose; e (3) bases nitrogenadas (Figura 1), e que se comportavam de maneira a formar uma estrutura em hélice complementar.

Os nucleotídeos são mantidos na fita por ligações denominadas de fosfodiéster, na qual um grupo fosforil fica entre os dois nucleotídeos, criando um esqueleto repetitivo de açúcar-fosfato e não permitindo quebras. O grupo fosforil também dá ao DNA a característica negativa (Figura 1). Os filamentos de nucleotídeos são mantidos juntos por ligações de hidrogênio, sendo que estas são sempre entre uma purina (guanina e adenina) e uma pirimidina (citosina e timina). O número de ligações de hidrogênio varia conforme a combinação das bases nitrogenadas, sendo três ligações

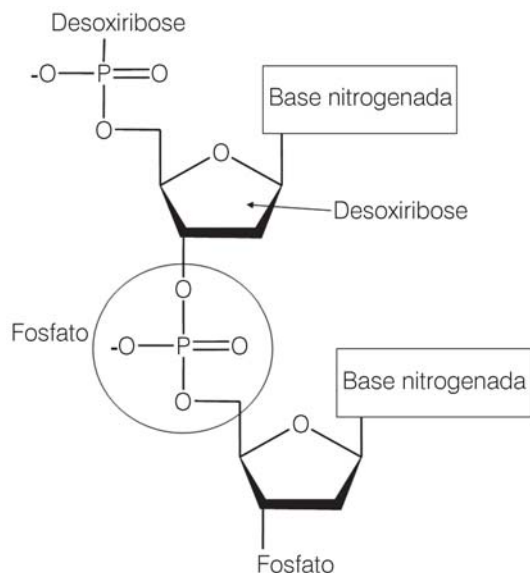


Figura 1: Representação esquemática da ligação entre dois nucleotídeos.

entre guanina e citosina e duas entre adenina e timina (Figura 2).

Esta estrutura complexa do DNA, mantida por ligações químicas covalentes e não covalentes, está organizada no núcleo. Logo, para que se possa ter acesso a ela, é necessário romper paredes celulares, membranas lipoprotéicas e diminuir a interação de proteínas necessárias para o empacotamento do DNA.

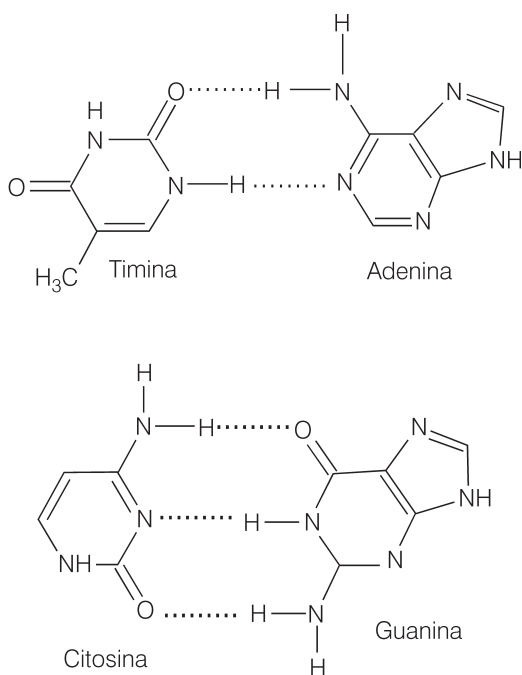


Figura 2: Detalhe das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas.

Material

- 1 tomate
- Cloreto de sódio (4 g equivalente a 4 colheres de café)
- Água
- Etanol 96% (álcool etílico comercial; como alternativa pode ser utilizado também álcool de cereais (99%) encontrado em lojas de produtos para perfumaria e farmácias de manipulação)
- Detergente comercial (6 mL)
- Gelo (4 a 5 bandejas)
- Papel de filtro
- Bandeja plástica (para fazer banho de gelo)
- Faca
- Funil
- Béquer de 500 mL
- Béquer de 100 mL
- Termômetro
- Tubos de ensaio
- Tripé e tela de amianto
- Mixer ou liquidificador

Procedimento experimental

Em um béquer de 500 mL, picar o tomate com uma faca e depois triturá-lo, utilizando um mixer durante 10 s.

Em um béquer de 100 mL, preparar a solução de lise: 6 mL de detergente concentrado, 4 g de cloreto de sódio, completando o volume com água até 60 mL.

Adicionar a solução de lise (60 mL) ao béquer de 500 mL contendo o tomate triturado.

Homogeneizar a solução de lise com a polpa de tomate e colocar o béquer em banho-maria (55 °C) por 10 min, cuidando para que a solução não entre em fervura.

Preparar um banho de gelo em uma bandeja.

Após os 10 min de banho-maria, transferir o béquer para o banho de gelo por um período de 5 min.

Filtrar 4 mL da solução para um tubo de ensaio.

Adicionar 4 mL de etanol gelado ao tubo de ensaio. Durante a adição do etanol, observar atentamente o que ocorre no tubo.

Resultados e discussão

O processo de extração de DNA envolve, a princípio, três procedimentos básicos: 1) lise dos tecidos e células; 2) remoção de proteínas e outros fragmentos de material do DNA; e 3) precipitação do DNA. As etapas realizadas nesse procedimento de extração do DNA, no caso o tomate, estão na Figura 3.

As etapas apresentadas no fluxograma da Figura 3 estão ilustradas na Figura 4.

No processo de extração de DNA, cada uma das etapas tem a sua importância. Segue-se assim a discussão e a explicação de cada uma delas:

- A homogeneização do tecido (aumento da superfície de contato) faz com que a parede celular seja rompida. Esse aumento faz com que a solução de lise aja sobre um maior número de células, liberando um grande número de moléculas de DNA. As substâncias utilizadas para provocar a lise das células e os núcleos são o detergente e o sal.

Como as membranas plasmática e nuclear são compostas principalmente por lipídios, as moléculas de detergente as desestruturam e provocam a sua ruptura, deixando assim o DNA disperso na solução.

- A adição do sal (NaCl) proporciona um ambiente favorável para extração do DNA, pois o sal, depois de dissolvido, sofre dissociação e contribui com íons positivos (Na^+), que neutralizam a carga negativa do grupo fosfato do DNA, e com íons negativos (Cl^-), que por sua vez neutralizam a carga positiva das proteínas ligadas inicialmente ao DNA. Dessa forma, a molécula de DNA não sofre repulsão de cargas entre si, o que favorece sua aglomeração.

- O aumento da temperatura aumenta a energia cinética entre as moléculas, favorecendo o processo de solubilização das membranas pelo detergente. Além disso, a alta temperatura provoca a desnaturação térmica de várias proteínas e enzimas, dentre elas as DNAses que podem degradar o DNA.

- O choque térmico, processo responsável pela diminuição rápida da

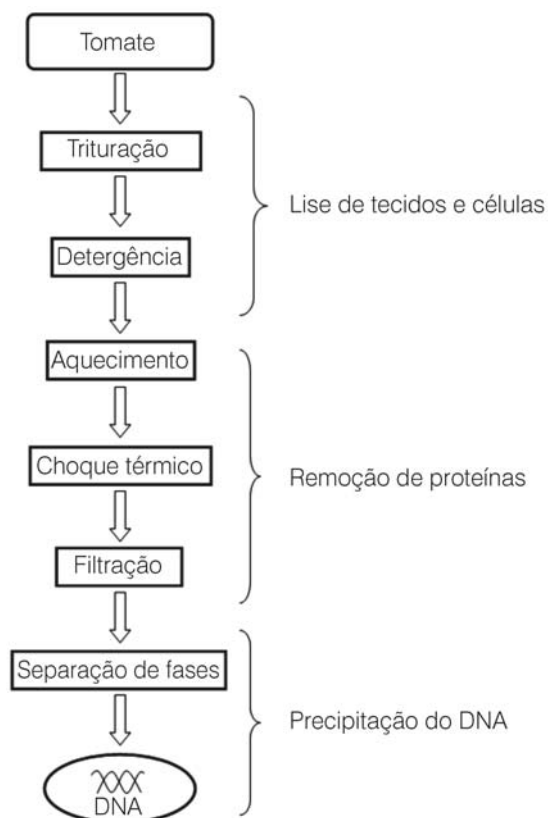


Figura 3: Fluxograma das etapas do processo de extração de DNA de tomate.

temperatura do sistema, serve para manter “inativadas” as proteínas e as enzimas. A diminuição brusca da temperatura desfavorece ainda a interação entre as fitas da molécula de DNA, mantendo-as abertas no meio.

- O processo de filtração faz com

que ocorra a separação entre partículas sólidas e líquidas.

- A adição do etanol gelado faz com que ocorra a precipitação do DNA devido a sua baixa solubilidade nesse solvente (quanto mais gelado, menor a solubilidade e melhor o processo extrativo). Nele também o DNA aumenta sua compactação e tende a formar fibras.

Nessa etapa final, após a formação da nuvem esbranquiçada no tubo de ensaio constituída por DNA (Figura 4g), pode-se introduzir um bastão de vidro no tubo e, com movimentos circulares, enrolá-lo no bastão.

Considerações finais

Este artigo propõe uma estratégia didática para a experimentação de química em escolas de Ensino Médio, associando métodos de extração, efeito de detergentes, interações iônicas e solubilidade. No entanto, cabe ressaltar que, embora ilustrativo, o procedimento realizado proporciona a obtenção de uma quantidade de DNA impuro. A extração de DNA pode ser realizada a partir de outros alimentos como: cebola, kiwi, morango e figado,

utilizando-se procedimento semelhante.

Questões para discussão

- 1) Qual a importância química da utilização de sal em uma das etapas de extração de DNA?
- 2) Qual a característica química presente na molécula de detergente (tensoativo) responsável pela lise das membranas celulares?
- 3) Por que é necessária a utilização de etanol gelado em vez de etanol em temperatura ambiente na extração de DNA? Qual o efeito da temperatura na solubilidade do DNA no etanol?

Renata de Lima (renata.lima@uniso.br), mestre em Genética pela UFSCar, atualmente é doutoranda em Genética Médica pela Unicamp e coordenadora do curso de Biotecnologia da Uniso. **Leonardo Fernandes Fraceto** (fraceto@unicamp.br), doutor em Biologia Funcional e Molecular pela Unicamp, é professor no curso de Engenharia Ambiental da Unesp/Campus Sorocaba.

Para saber mais

BRACHT, A. e ISHII-IWAMOTO, E.L. *Métodos de laboratório em bioquímica*. São Paulo: Manole, 2003.

BRODY, D.E. e BRODY, A.R. *As sete maiores descobertas científicas da história e seus autores*. São Paulo: Companhia das Letras, 1999.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T. e MILLER, J.H. *Introdução à genética*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSHY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D. e DARNELL, J. *Biologia celular e molecular*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M. e LOSICK, R. *Biologia molecular do gene*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Na internet

http://www.ucbiotech.org/edu/edu_aids/TomatoDNA.html.

<http://www.odnaviaiescola.com/links.htm>.

Abstract: Chemical Approach to Tomato's DNA Extraction – In this article, a simple experiment is presented: the extraction of DNA of tomatoes using laboratories procedures of easy execution and reagents of low cost. It is a current subject from which one might teach a basic series of chemical and biochemical concepts.

Keywords: extraction processes , DNA, tomato

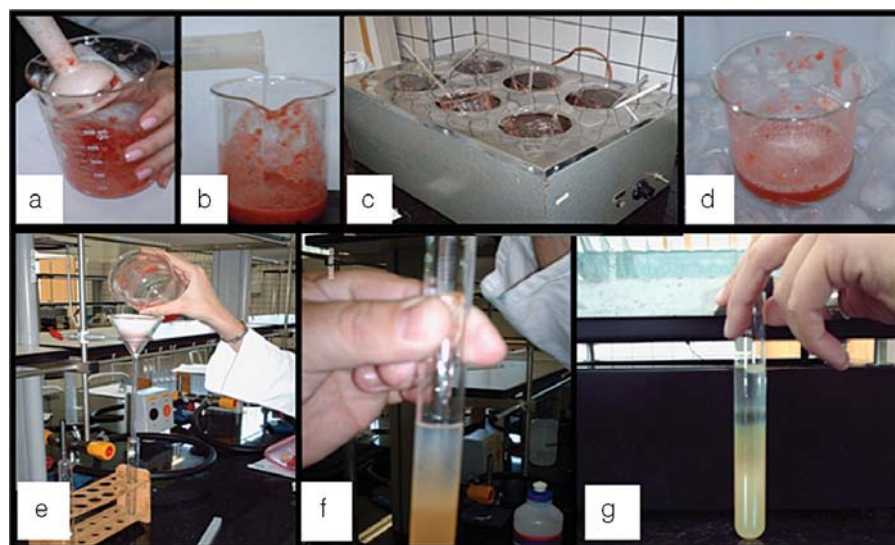


Figura 4: Etapas realizadas para a extração do DNA do tomate: a) processo de trituração; b) adição de solução de lise; c) aquecimento; d) choque térmico; e) filtração; f) separação de fases (adição de etanol gelado); e g) precipitação do DNA.