

DIFERENCIAÇÃO DE CULTIVARES DE FEIJÃO DE ORIGEM TRANSGÊNICA E CONVENCIONAL POR RMN HR-MAS DE ^1H E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

CHOZE, Rafael¹; **ALCANTARA**, Glauca Braz²; **FARIA**, Josias Corrêa³; **LIÃO**, Luciano Morais⁴

¹ Bolsista de Doutorado/Instituto de Química/UFG Lab. de RMN - rafze@hotmail.com

² Co-Orientador/Instituto de Química/UFG – Lab. de RMN- glabraz@yahoo.com.br

³ Pesquisador/ Embrapa Arroz e Feijão – josias@cnpaf.embrapa.br

⁴ Orientador/ Instituto de Química/UFG – Lab. de RMN- luciano@quimica.ufg.br

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; Transgênico; RMN

1 INTRODUÇÃO

Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uma fonte rica e barata de proteínas, carboidratos, fibras alimentares e vitaminas para milhões de pessoas nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Além de ser uma fonte de nutrientes essenciais, hoje o feijão está recebendo cada vez mais atenção como alimento funcional e o seu consumo tem sido associado a risco reduzido de doença cardiovascular, diabetes mellitus, obesidade, câncer e doenças do trato digestivo (Viswanathan et., 1989).

A produção comercial de feijão é bem distribuída em todo o mundo, sendo o Brasil e a Índia os maiores produtores de feijão. No Brasil, a produção nacional foi de 3,6 milhões de toneladas grãos em 2009 (IBGE, 2009). No entanto, doenças como BGMV (Bean Golden Mosaic Virus), transmitido pela mosca branca (*Bemisia tabaci* Gen.), têm sido o maior obstáculo à produção de feijão na América Latina e provoca perdas significativas na produtividade (4-10%) na América do Sul e Central, México e Estados Unidos (Morales e Anderson 2001).

Várias estratégias têm sido empregadas pela Embrapa Arroz e Feijão para o controle da doença. Assim, várias linhagens geneticamente modificadas foram desenvolvidas a partir do cultivar Olathe Pinto, onde a linhagem Olathe Pinto 5,1 apresentou resistência total ao vírus BGMV. Os cultivares Perola e Pontal, através de cruzamentos e retrocruzamentos com Olathe 5.1, também mostraram resistência ao BGMV.

A RMN (Ressonância Magnética Nuclear) baseia-se em sinais de ressonância dos núcleos girando em um campo magnético e isótopos naturais como ^1H e ^{13}C podem ser observados, sendo relevantes em muitos estudos de materiais intactos.

Amostras semi-sólidas (sólido hidratado) proporcionam um aumento das larguras de linha e sobreposição espectral devido às interações anisotrópicas e susceptibilidade magnética. Portanto, a técnica HR-MAS (High-Resolution Magic angle Spinning), onde as amostras são giradas em uma frequência baixa em torno de seu próprio eixo em um ângulo mágico 54,7 em relação ao campo magnético (Sakellariou et al., 2005) é uma técnica que resulta em uma melhoria de resolução espectral. HR-MAS tem sido amplamente utilizada em materiais intactos, tais como alimentação, classificação taxonômica de espécies vegetais, tecidos e células (Brecia et al., 2002; Alcantara et al., 2007). Muitas vezes a riqueza de informações resulta em uma complexidade espectral; sendo assim o uso de análise multivariada para estudar um grande número de espectros e extrair a informação significativa é extremamente necessário.

Portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar as diferenças na composição química dos grãos dos cultivares Olathe Pinto convencional e o seu geneticamente modificado (Olathe Pinto 5.1) e uma possível transferência gênica aos cultivares Pontal e Perola, utilizando a ressonância magnética nuclear, em análise particular da técnica HR-MAS, e técnicas quimiométricas.

2 METODOLOGIA

2.1 Coleta do material e preparação da amostra

Os cultivares Olathe Pinto, Perola e Pontal e seus respectivos transgênicos, coletados na Estação Experimental da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio-GO, foram estudados. Todos os grãos foram plantados em pares e, portanto, em idênticas condições experimentais.

2.2 Análise dos espectros de ^1H NMR

Os espectros de ^1H RMN foram adquiridos em temperatura ambiente em um espectrômetro Bruker Avance III Tesla 500, utilizando uma sonda HR-MAS de 4 milímetros. As amostras foram suspensas em uma solução de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP- d_4) em D₂O (0,1 m / v), colocado em um rotor esférico 50 mL para

análise e foi girado em 5 kHz no ângulo mágico (54,7°), utilizando a sequência ZGCPDR para a pré-saturação do sinal da água.

2.3. Análise Quimiométrica

Todos os cálculos foram realizados usando o software Pirouette (v. 4.0, Infometrix) e PCA foi aplicada para explorar os dados. Cada espectro de RMN foi normalizado e aplicado a primeira derivada.

3 Resultados e Discussão

3.1 Análise dos espectros de ¹H RMN

A análise dos espectros de ¹H RMN do cultivar Olathe Pinto (convencional e transgênico) mostrou diferenças notórias nas intensidades dos sinais, na região entre δ 7,5 - 7,9 e δ 6,1 - δ 6,3, típica de flavonóides, como mostrado na Figura 1.

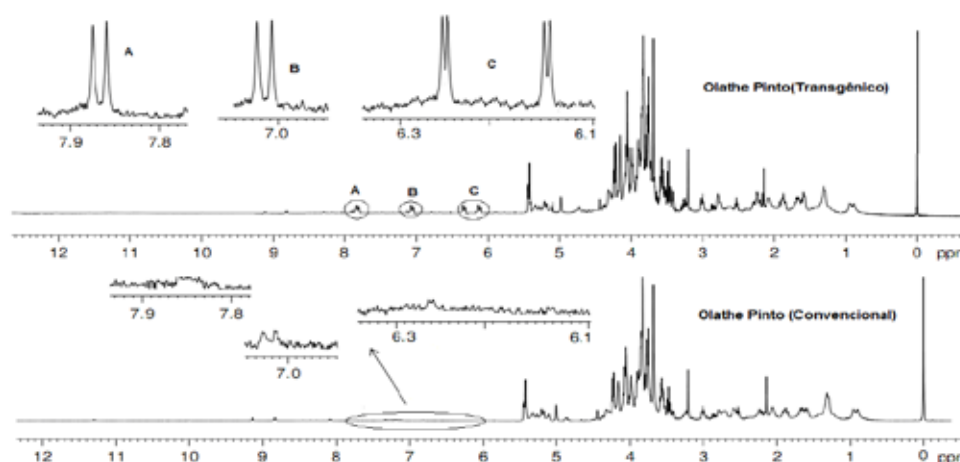


Figura 1. Espectro de ¹H NMR do feijão Olathe Pinto obtido na sonda HR-MAS.

Já a análise dos espectros de ¹H RMN dos cultivares Perola e Pontal apresentaram um perfil químico similar à amostra Pinto Olathe, destacando-se o feijão Pinto Olathe pela pequena diferença no teor de flavonóides em relação aos demais cultivares. A análise dos espectros de ¹H RMN dos cultivares geneticamente modificado, Pérola Pontal 5.1 e 5.1, mostram o mesmo padrão de sinal visualizado no cultivar Olathe Pinto 5.1. Essa informação indica uma transferência gênica, onde o teor de flavonóides nas amostras transgênicas é maior que nos cultivares convencionais (Figura 2).

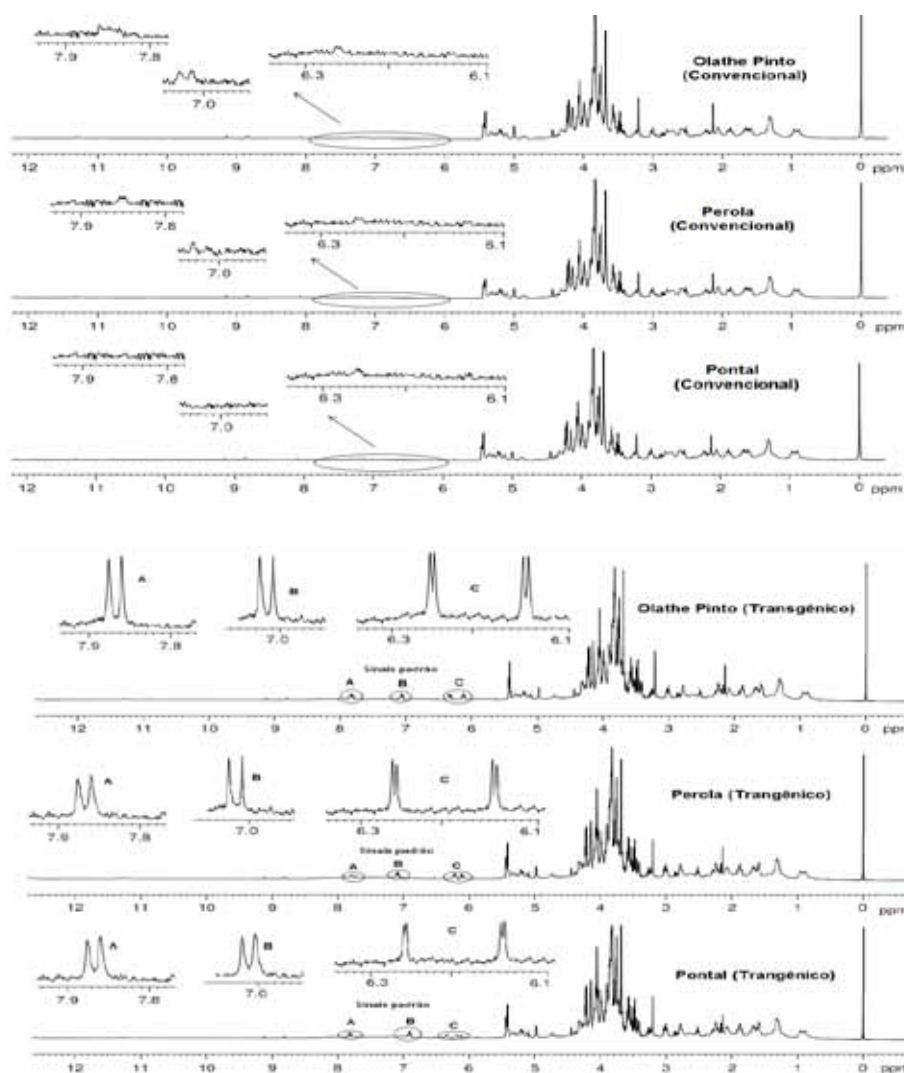


Figura 2. Comparação dos espectros de ^1H RMN, indicando o padrão de sinal visualizado na transferência gênica.

3.1 Análise da PCA aplicada aos espectros de ^1H RMN

A análise da PCA (Figura 3) confirmou o perfil químico de semelhança entre os cultivares convencionais Olathe Pinto, Perola e Pontal, bem como em relação aos cultivares Olathe Pinto, Perola e Pontal transgênicos, o que sugere um agrupamento natural dos dois grupos neste espaço (positivos e negativos PC1), onde a inspeção do lado positivo da PC1 confirmou que as amostras de plantas transgênicas apresentaram maior quantidade de flavonóides, porque de acordo com o gráfico de pesos correspondentes, a região do espectro que contribuiu para essa diferenciação está intimamente relacionada com os sinais típicos de flavonóides. Já o lado negativo da PC1 mostrou uma tendência de agrupamento dos cultivares convencionais.

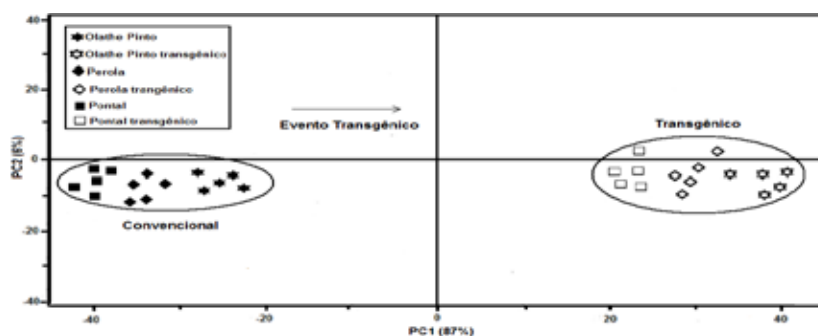


Figura 3. Escores de PCA dos cultivares de feijão estudados.

4 CONCLUSÃO

O estudo permitiu visualizar, pelas técnicas de RMN HR-MAS de ^1H e quimiométricas (PCA), diferenças entre os feijões convencionais e transgênicos, bem como a presença de sinais padrão nos cultivares Olathe Pinto, Perola e Pontal transgênicos, indicando a transferência gênica a partir do cultivar Olathe Pinto transgênico.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcantara, G. B.; Honda, N. K.; Ferreira, M. M. C.; Ferreira, A. G. **Chemometric analysis applied in ^1H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples.** *Analytica Chimica Acta*, 595: 3-8, 2007.
- Brescia, M. A.; Jambrenghi, A. C.; Martino, V.; Sacco, D.; Giannico, F.; Vonghia, G.; Sacco, A. **High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) studies on meat components. Potentialities and prospects.** *Italia Journal Animal Science*.1: 151, 2002.
- IBGE. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>, Acessado em 03/05/2009.
- Morales, F.J.; Anderson, P.K. **The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America.** *Archives of Virology*. 146: 415-441, 2001.
- Sakellariou, D.; Meriles, C.A.; Martin, R.W.; Pines, A. **NMR in rotating magnetic fields.** *Magnetic Resonance Imaging* 23: 295-299, 2005.
- Viswanathan, M.; Ramachandran, A.; Indira, P.; Snehalatha, C.; Mohan, V.; Kymal, P. K. **Responses to legumes in NIDDM subjects: lower plasma glucose.** *Nutrition Reports International*. 40: 803-812, 1989.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CAPES/FINEP