

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 $54,7^\circ$ 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.

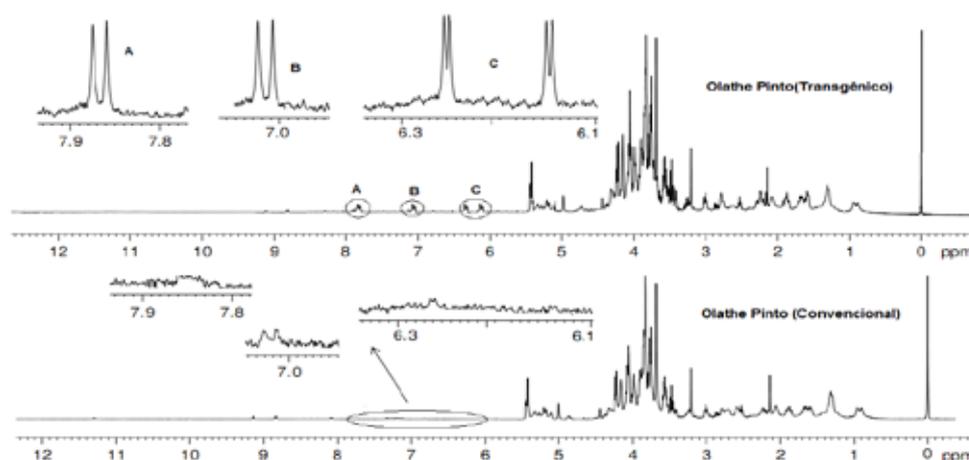


Figura 1. Espectro de ^1H NMR do feijão Olathe Pinto obtido na sonda HR-MAS.

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).

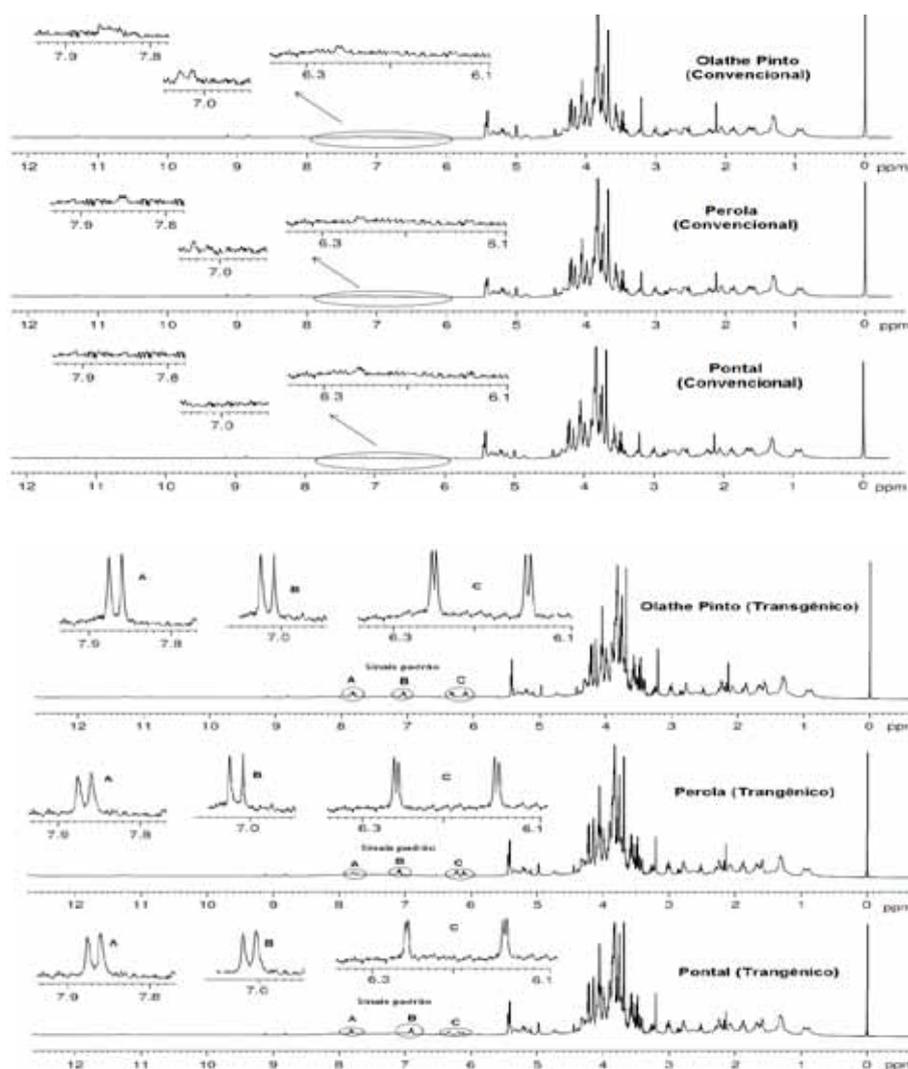


Figura 2. Comparação dos espectros de ^1H RMN, indicando o padrão de sinal visualizado na transferência gênica.

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.

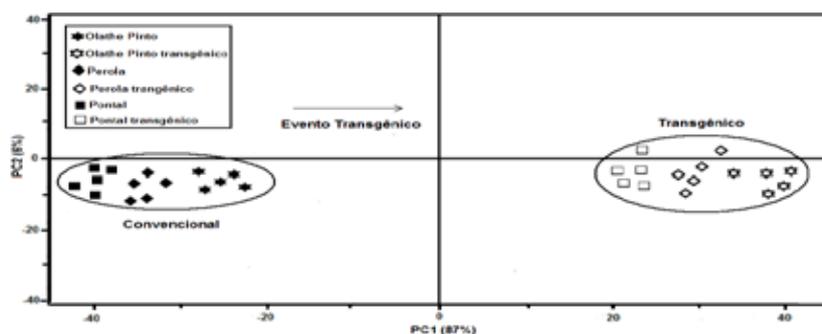


Figura 3. Escores de PCA dos cultivares de feijão estudados.

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