

Estudo do Perfil Oxidativo de Feijões Transgênicos por meio da RMN HR-MAS

Erick de Oliveira Lemes ¹
Rafael Choze ²
Joel Rocha da Silva ³
Daiana da Silva Vargem ⁴

RESUMO:

No Brasil, o feijão é uma das leguminosas alimentares mais importantes, sendo considerada a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda. Uma das principais doenças que atingem os feijoeiros é mosaico dourado, transmitido pela mosca branca, pelo vírus BGMV (Bean Golden Mosaic Virus). Deste modo, a EMBRAPA Arroz e Feijão desenvolveu um genótipo resistente ao BGMV, denominado Olathe 5.1. Outras duas linhagens geneticamente modificadas foram produzidas (Tesouro 5.1 e Marfim 5.1). Os espectros de RMN de ¹H HR-MAS conduziram às estruturas dos flavonóides quercetina e miricetina, presentes em maior concentração no feijão geneticamente modificado. Deste modo foi realizado um estudo do perfil oxidativo destes cultivares, onde o flavonóide miricetina sofreu uma variação em seu teor devido à exposição destes genótipos às condições físicas não controladas.

Palavras chave: Flavonóides; HR-MAS; Quimiometria.

¹ Graduado em Farmácia pela Faculdade Anhanguera de Anápolis. Brasil. erickprojetocientifico@outlook.com

² Doutor em Química Orgânica (RMN) pela Universidade Federal de Goiás. Docente na Universidade Federal de Goiás e Pesquisador da Faculdade Anhanguera de Anápolis/GO. Brasil. rafze@hotmail.com

³ Mestre em Química pela Universidade Federal de Goiás – UFG. Brasil. jo.rochas@hotmail.com

⁴ Mestre em Ciências Ambientais pelo Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA. Coordenadora de curso na Faculdade Anhanguera de Anápolis. Brasil. daiana.vargem@anhanguera.com

O feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae), é uma das mais importantes fontes de proteínas, fibras alimentares, ferro, carboidratos complexos, minerais e vitaminas para milhões de pessoas em países desenvolvidos e em desenvolvimento. A produção comercial de feijão é bem distribuída em todo o mundo, sendo o Brasil e a Índia os maiores produtores. No Brasil, a produção nacional foi de 3,6 milhões de toneladas grãos em 2009 (Perazzini et al. 2008).

Além de ser uma fonte de nutrientes essenciais, o feijão possui constituintes químicos que são considerados componentes com ação funcional, como os flavonóides, incluindo flavonóis, glicosilados ou não, antocianidinas, proantocianidinas e isoflavonas, bem como ácidos fenólicos. (Cardador-Martinez et al. 2002).

Alimento funcional é um “alimento convencional ou similar a este em aparência, consumido como parte da dieta normal, que apresenta efeitos fisiológicos benéficos e/ou reduz o risco de doenças crônicas, além de suas funções nutricionais básicas”. Deste modo, a influência dos fatores edafoclimáticos na composição química dos feijões é importante na preservação destes metabólitos. (Perazzini et al. 2008).

O mosaico dourado é uma das principais doenças que afetam a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), dificultando a produção de feijão ou mesmo inviabilizando-a em várias regiões. No Brasil, a denominação atual para a espécie viral encontrada é Bean golden mosaic virus (BGMV).

BGMV, um geminivirus, é transmitido pela mosca branca (*Bemisia tabaci* Gen.), pertencente ao gênero *Bemisia* (Família Geminiviridae), sendo que sua incidência nas plantações de feijão comum é maior no período de seca quando a população de *B. tabaci* é aumentada.

Os sintomas são evidenciados quando as plantas apresentam de duas a quatro folhas trifolioladas manifestando-se por um amarelecimento intenso da lâmina foliar delimitado pela coloração verde das nervuras, dando um aspecto de mosaico. As folhas das plantas infectadas podem apresentar-se deformadas e manchadas, afetando a qualidade das sementes conforme mostrando a Figura 01.

Figura 01. Planta geneticamente modificada (direita), imune à doença do mosaico dourado e planta não modificada (esquerda).



Fonte: Lin L, Harnly JM, Pastor-Corrales MS, Luthria DL, 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107. p. 399.

Visando o controle da doença causada pelo vírus BGMV, várias estratégias têm sido utilizadas, com a ajuda da engenharia genética, no sentido de desenvolver plantas transgênicas resistentes ao vírus. Para a maioria das begomoviroses tem-se aplicado a expressão de truncagem de genes defeituosos (Antignus et al. 2004, Brunetti et al. 1997, Chellappan et al. 2004, Duan et al. 1997) e silenciamento de RNA (Asad et al. 2003, Zhang et al. 2005).

Deste modo, a Embrapa Arroz e Feijão, juntamente com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, desenvolveram várias linhagens geneticamente modificadas para conter a replicação do vírus BGMV, destacando-se a linhagem Olathe 5.1 que apresentou total resistência ao vírus BGMV. Este cultivar Olathe Pinto não é comercial no Brasil e foi escolhido para ser transformado geneticamente por apresentar boa exposição de seu tecido meristemático e capacidade de crescer “in vitro”.

Linhagens de genótipos dos feijões comerciais Marfim e Tesouro receberam a transgene do cultivar Olathe 5.1, através de cruzamentos e 4 retrocruzamentos, e também apresentaram completa resistência ao BGMV. Estes cultivares, por não terem o tecido meristemático exposto, são pouco suscetíveis as transformações gênicas; assim realizar o cruzamento e transferir o transgene é mais simples e eficiente em feijões.

A associação entre a espectroscopia de RMN HR-MAS e procedimentos quimiométricos, como a Análise por Componentes Principais (PCA), tem recebido muita atenção de pesquisadores de diversas áreas por se tratar de uma ferramenta analítica rápida que pode detectar diferenças no perfil químico de amostras em uma única análise.

A quimiometria é uma ferramenta matemática para análise multivariada de dados, utilizando modelos estatísticos para se calcular e extrair informações a partir de um conjunto de dados. O desenvolvimento de modelos quimiométricos para uma variedade de resultados, basicamente, implica em uma intuitiva visualização dos dados ilustrados por meio de gráficos (Manly 1994).

Dentre as técnicas quimiométricas, destaca-se a PCA, onde ocorre uma transformação linear ortogonal que transporta os dados para um novo sistema de coordenadas, tal que a maior variância será definida como componente principal. (Goldbarg 2000).

Além da transformação dos dados espectrais em matrizes e antes das análises propriamente ditas, faz-se necessário a aplicação de certas manipulações matemáticas denominadas de pré-processamentos.

O processo de auto-escalamento consiste em padronizar a escala de todas as variáveis para desvio-padrão igual a um. Deste modo assume-se que todas as variáveis possuem o mesmo peso para o

modelo. Diferentemente, o pré-processamento centrado na média somente conduz as variáveis à mesma média.

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o perfil oxidativo de três cultivares feijões (*Phaseolus vulgaris*) geneticamente modificados (Olathe 5.1, Marfim 5.1 e Tesouro 5.1) semeados em casa de vegetação, através da técnica de RMN HR-MAS e análise quimiométrica.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com três diferentes cultivares de feijão comum (Olathe Pinto, Vereda, Tesouro e Marfim) cultivados sob as mesmas condições e época de plantio, na EMBRAPA Arroz e Feijão, no município de Santo Antônio de Goiás.

Para as aquisições dos espectros de RMN HR-MAS, os embriões foram removidos das sementes e moídos em um almofariz com o auxílio de nitrogênio líquido, até formar um pó. Vale destacar que a parte embrionária da semente foi escolhida devido a uma tendência do embrião em acumular a maior quantidade de informações químicas em eventos transgênicos.

Deste modo, aproximadamente 4 mg do grão já pulverizado, foi acondicionado em um rotor de zircônio de 12 μ L ou 50 μ L, seguido da adição de duas ou três gotas de uma solução de trimetilsilil propionato de sódio (TMSP-d4) em D2O (0,1% m/v). Nesse caso, o solvente deuterado foi usado para o ajuste da homogeneidade do campo magnético, “lock” do equipamento e para proporcionar maior mobilidade das moléculas nas amostras. Para a amostra alcançar o volume esférico, alguns componentes que fazem parte do rotor são necessários como: um espaçador e um micro parafuso, este último tem a função de evitar a saída da suspensão D2O+amostra.

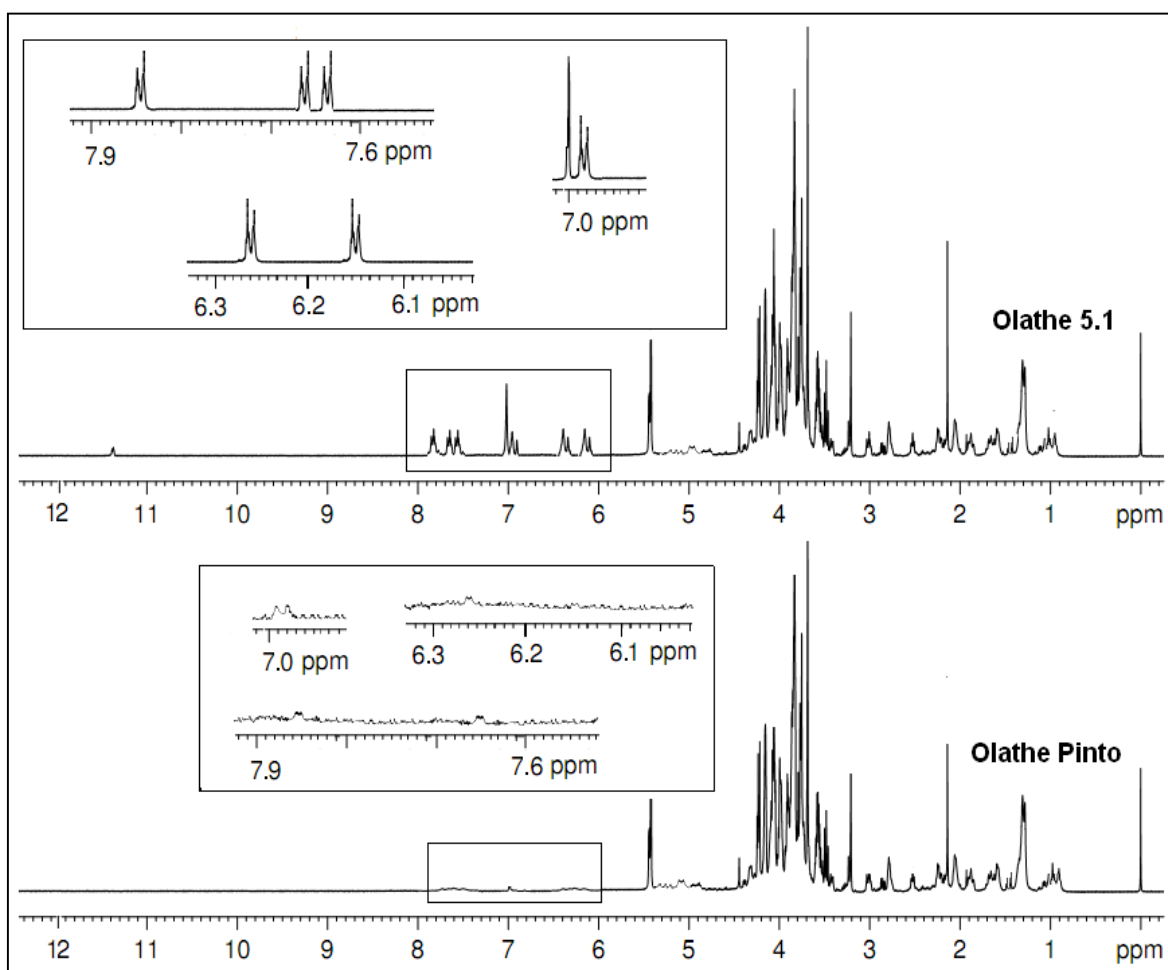
Todas as medidas foram realizadas a 28°C em um espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500, 13 MHz para 1H e 125 MHz para 13C) equipado com uma sonda HR-MAS de 4 mm com gradiente de campo na direção do ângulo mágico juntamente com um rotor de óxido de zircônio com volume esférico de 50 mL. Para as análises quimiométricas foi utilizado o programa Matlab.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi realizada uma análise dos cultivares transgênicos e convencionais, estes estando em condições de umidade e luz controladas. Os espectros são mostrados nas Figuras 02 e 03.

Os espectros desses cultivares apresentaram diferenças expressivas nas intensidades dos sinais na região de δ 6,0-7. Nesta região normalmente aparecem os sinais de flavonóides, uma classe de compostos muito comum em feijão (Lin et al 2008).

Figura 02. Diferenças introduzidas pela transgene na região de δ 6,0-7,9



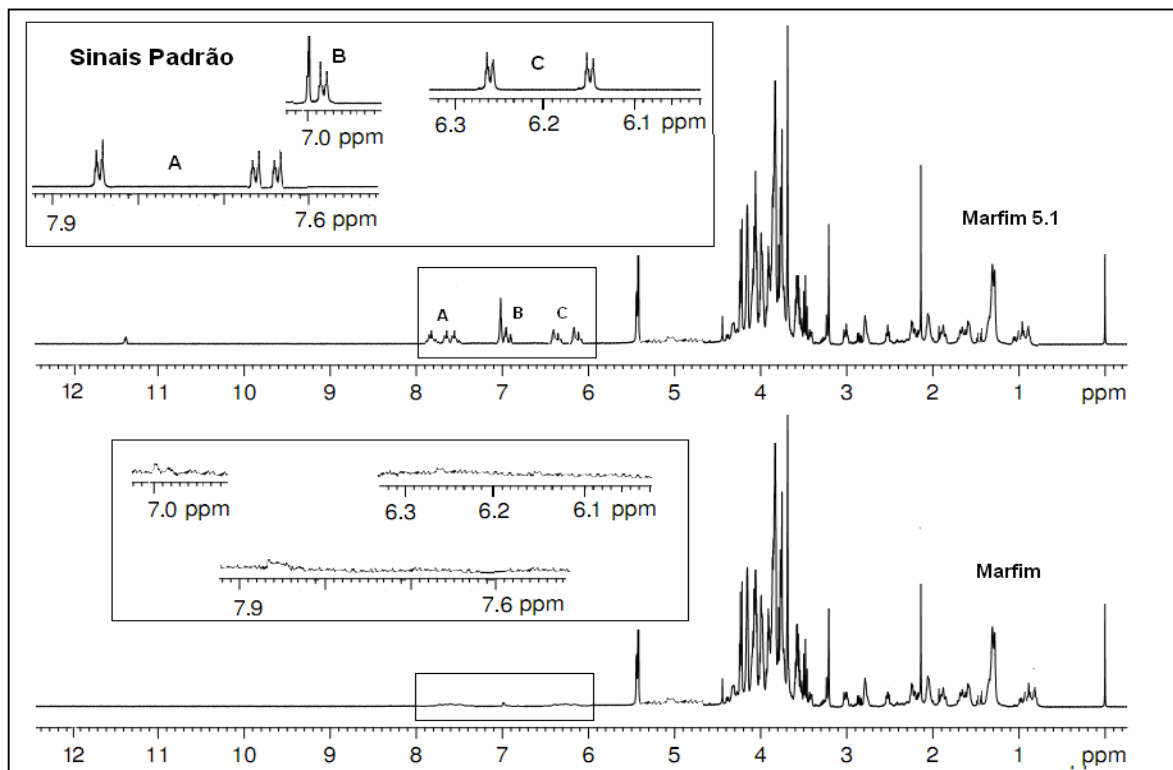
Fonte: O Autor.

Uma vez que as cultivares transgênicas possuem o maior teor de flavonóides, optou-se em estudar o perfil oxidativo destes genótipos, com o intuito de verificar se a exposição destes cultivares a condições não controladas de umidade e luz influenciaria no teor destes compostos.

A análise dos espectros de RMN de ^1H HR-MAS dos embriões dos feijões Olathe 5.1 (Figura 4), após 30 dias de exposição ao ambiente, revelaram uma variação no teor do flavonóide miricetina. Pelos espectros foi observada a diminuição da intensidade dos singletos em δ 7.05 e dubletos em δ 6.15 e 6.35. Percebe-se também o aparecimento de outros sinais, cuja atribuição é de complexidade, na região de δ 6.60 a 6.80. Já os sinais referentes ao flavonóide quercetina, aparentemente não apresentaram variação em suas intensidades. Uma segunda análise foi realizada (Figura 05), após 60 dias de exposição ao ar e os resultados mostraram um maior decréscimo nas intensidades dos sinais da miricetina e novamente; a preservação dos sinais do flavonóide quercetina. Estes resultados podem ser visualizados pelas integrações relativas dos sinais em relação ao hidrogênio glicosídico da rafinose (integração para 1 hidrogênio). Os espectros resultantes do tempo de exposição deste cultivar podem

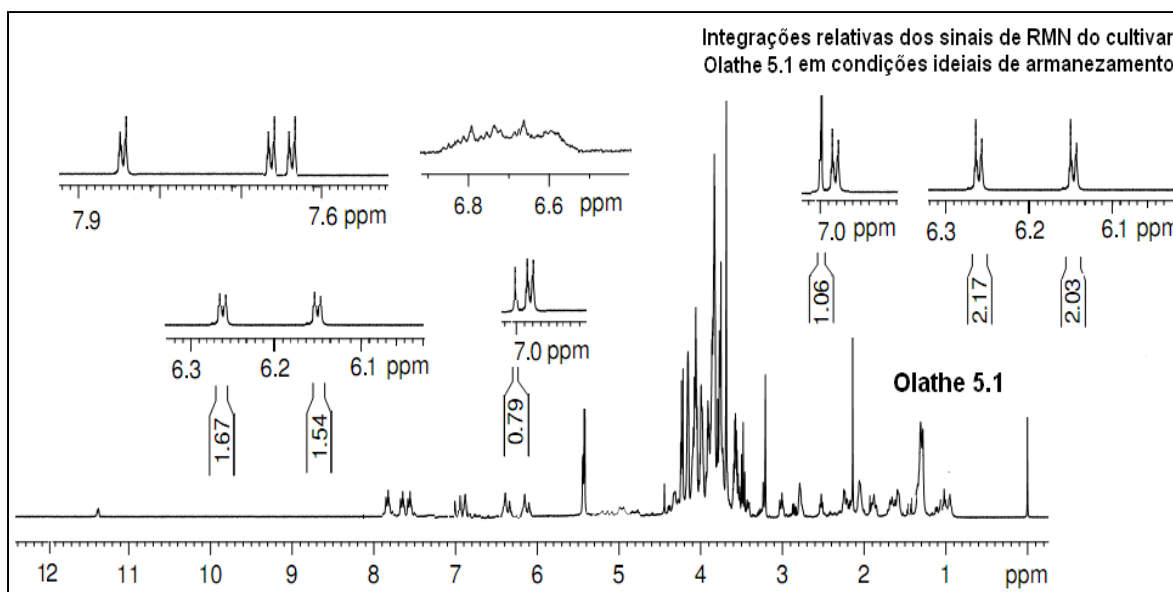
ser comparados com o espectro do cultivar Olathe 5.1, armazenado de forma adequada, conforme já apresentado na Figura 02 e novamente mostrado na Figura 04.

Figura 03. Espectros de RMN de ^1H HR-MAS dos genótipos Marfim e Marfim 5.1



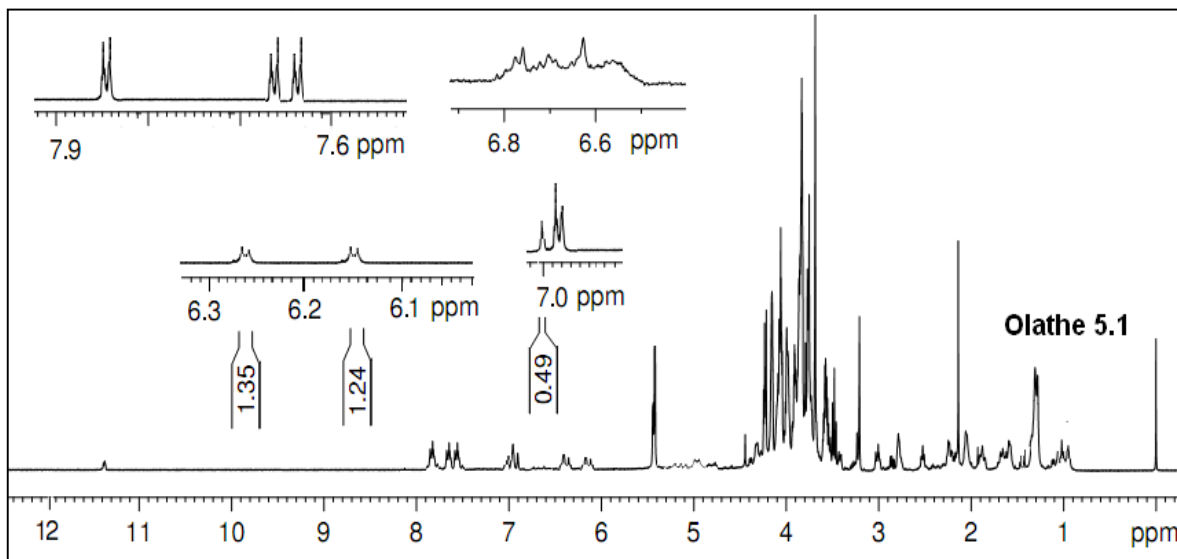
Fonte: O Autor.

Figura 04. Espectro de RMN de ^1H HR-MAS do feijão Olathe 5.1 passados 30 dias de exposição ao ambiente



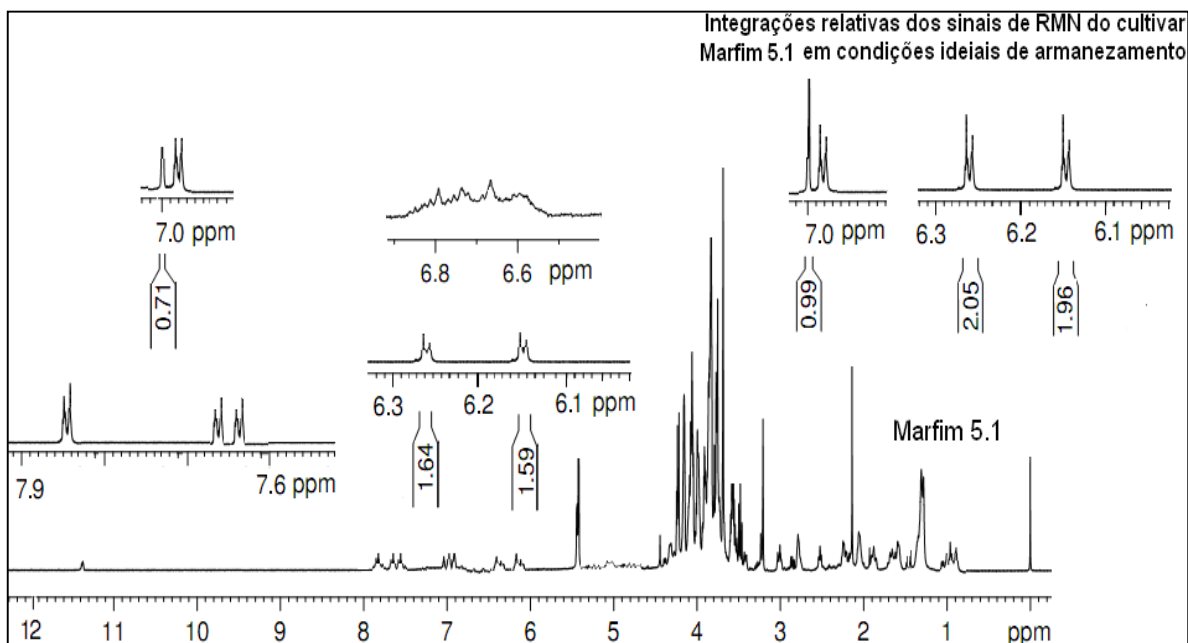
Fonte: O Autor.

Figura 05. Espectro de RMN de ^1H HR-MAS do feijão Olathe 5.1 passados 60 dias de exposição ao ambiente



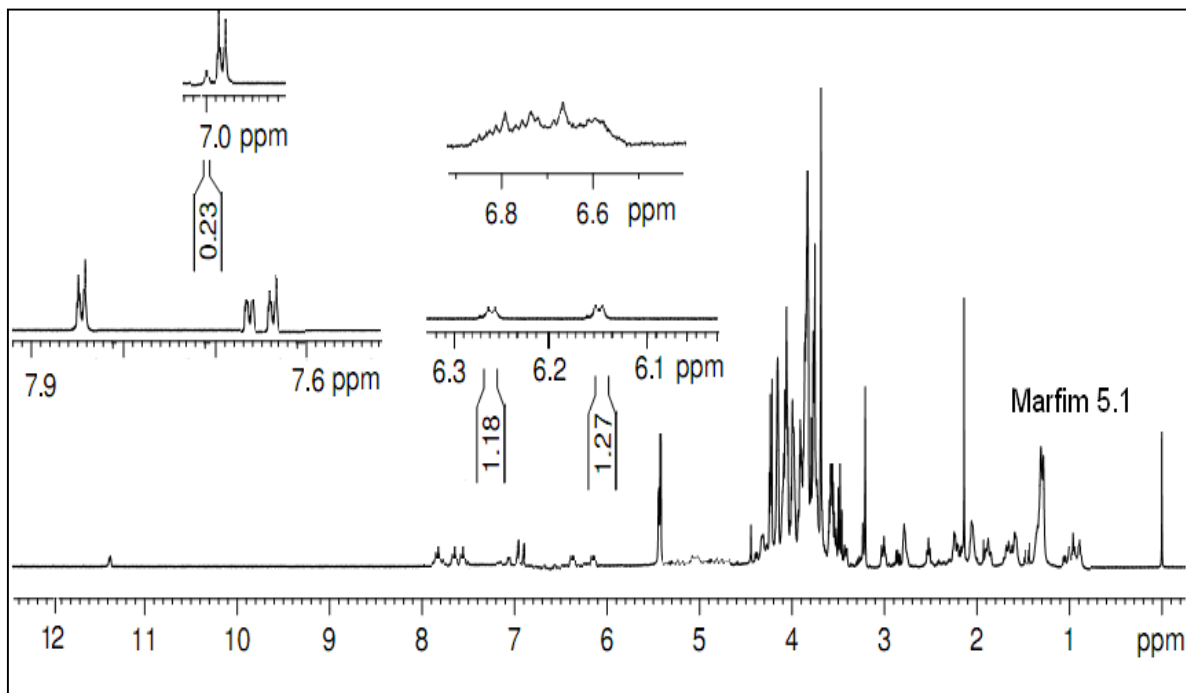
Fonte: O Autor.

Figura 06. Espectro de RMN de ^1H HR-MAS do feijão Marfim 5.1 passados 30 dias de exposição ao ambiente



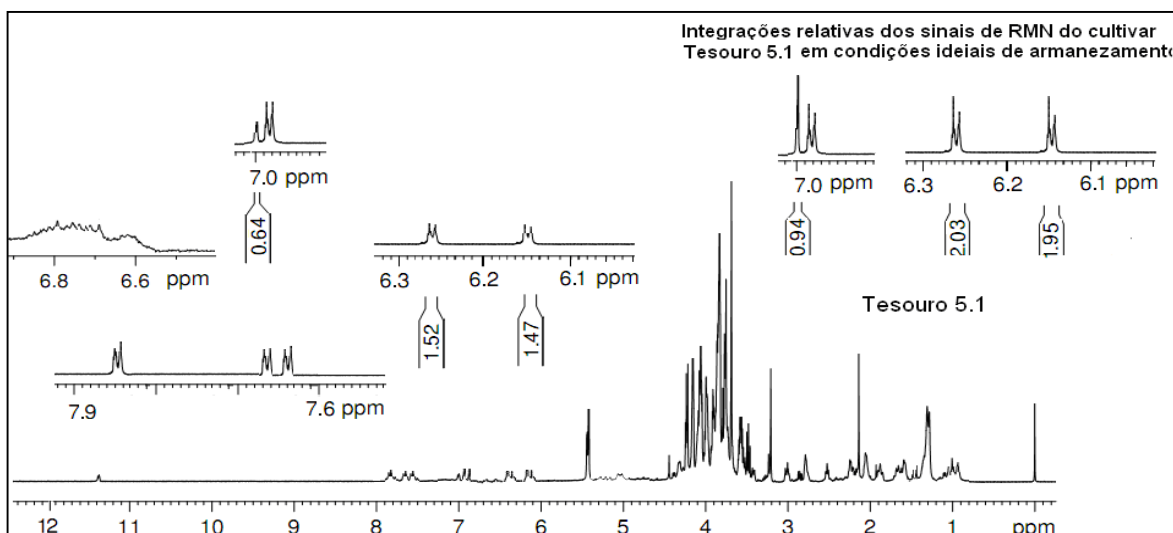
Fonte: O Autor.

Figura 07. Espectro de RMN de ^1H HR-MAS do feijão Marfim 5.1 passados 60 dias de exposição ao ambiente



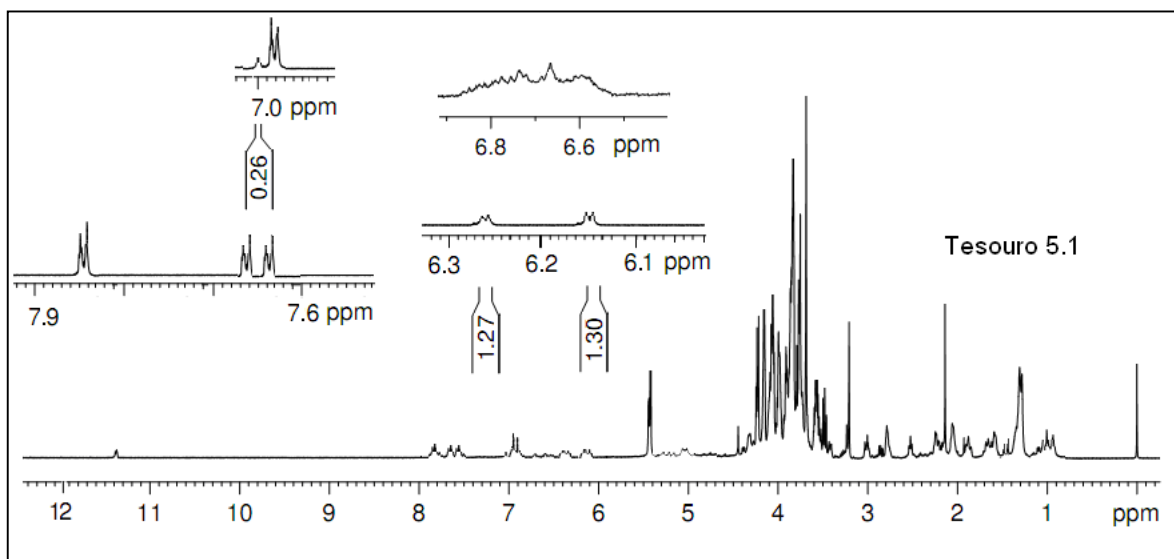
Fonte: O Autor.

Figura 08. Espectro de RMN de ^1H HR-MAS do feijão Tesouro 5.1 passados 30 dias de exposição ao ambiente



Fonte: O Autor.

Figura 09. Espectro de RMN de ^1H HR-MAS do feijão Tesouro 5.1 passados 60 dias de exposição ao ambiente



Fonte: O Autor.

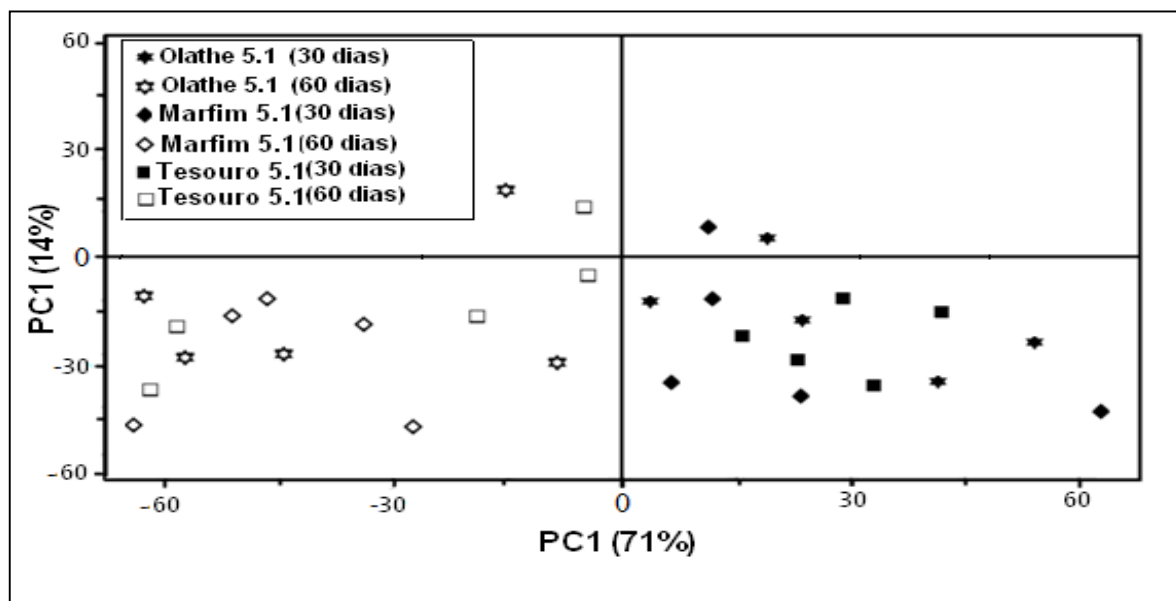
Estes feijões também foram expostos ao tempo de 90 dias sob condições de armazenamento não apropriadas e o resultado obtido foi um declínio maior do teor de miricetina.

Pode-se concluir que os feijões de origem transgênica sofreram alterações em suas composições químicas, especialmente em relação ao flavonóide miricetina, na qual ocorreu uma diminuição significativa de seu teor ao longo do tempo de exposição dos feijões ao ar, mantendo-se preservado, aparentemente, todos os outros sinais do espectro. Portanto, as condições de armazenamento dos feijões transgênicos é fator limitante para preservação dos compostos fenólicos nestes cultivares.

Posteriormente foi realizada uma PCA (Figura 10), selecionado apenas a região de hidrogênios aromáticos e os resultados corroboraram as conclusões obtidas através da RMN. Percebe-se então uma distinção entre os feijões transgênicos de acordo com o tempo de exposição destes ao ar. A PC1 foi à componente responsável por esta separação, onde os feijões expostos ao ar no tempo de 30 dias localizaram-se em regiões positivas de PC1 e, a região negativa de PC1 agrupou as amostras expostas ao tempo de 60 dias. Os dados foram normalizados e autoescalados.

A análise dos loadings demonstrou que as variáveis responsáveis por esta separação se referem aos sinais da miricetina em δ 7.05 e entre δ 6.25 e 6.15. Deste modo pode-se concluir que a PC1, com 71% da variância explicada, corresponde à variação do teor de miricetina em função do tempo de exposição dos feijões.

Figura 10. Representação dos feijões transgênicos cultivados em casa de vegetação na análise de PCA quando expostos ao ambiente, em dois tempos distintos: 30 dias e 60 dias



Fonte: O Autor.

CONCLUSÃO

O estudo oxidativo dos cultivares de feijão indicou uma variação no teor do flavonóide miricetina, visualizado pelo decréscimo da intensidade de seus sinais no espectro. Além disso, observou-se o aparecimento de outros sinais de difícil atribuição na região aromática do espectro. Já o teor do flavonóide quercetina, aparentemente não apresentou variação.

Por fim, este trabalho aponta para a simplicidade do uso da técnica de RMN HR-MAS para análises de alimentos. A medida é extremamente simplificada, pois requer apenas a moagem e a adição de uma pequena quantidade de D₂O, necessária para hidratação do material e ajuste da homogeneidade do campo magnético (shimming).

REFERÊNCIAS

Antignus Y, Vunsh R, Lachman O, Pearlsman M, Maslhin L, Hanany U, Rosner A 2004. Truncated Rep gene originated from Tomato yellow leaf curl virus-Israel (Mild) confers strain-specific resistance in transgenic tomato. *Annals of Applied Biology*, 144. p. 39.

Asad S, Haris WA, Bashir A, Zafar Y, Malik KA, Malik NN, Lichtenstein CP 2003. Transgenic tobacco expressing geminiviral RNAs are resistant to the serious viral pathogen causing cotton leaf curl disease. *Archives of Virology*, 148. p. 2341.

Brunetti A, Tavazza M, Noris E, Tavazza R, Caciagli P, Ancora G, CRESPI S, Accotto GP 1997. High expression of truncated viral Rep protein confers resistance to Tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10:571-579.

Cardador-Martínez A, Loarca-Piña G, Oomah BD 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50. p. 6975.

Chellappan P, Masona MV, Vanitharani R, Taylor N, Fauquet C 2004. Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in cassava. *Plant Molecular Biology*, 56. p. 601.

Duan YP, Powell CA, Purcifull DE, Broglio P, Hiebert E 1997. Phenotypic variation in transgenic tobacco expressing mutated geminivirus movement/pathogenicity (BC1) proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10. p. 1065.

Lin L, Harnly JM, Pastor-Corrales MS, Luthria DL 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107. p. 399.

Manly BJF 2008. Métodos estatísticos multivariados: uma introdução. Porto Alegre: *Bookman*. 2008.

Perazzini R, Leonardi D, Ruggeri S, Alesiani D, D'Arcangelo A, Canini A 2008. Characterization of *Phaseolus vulgaris* L. Landraces Cultivated in Central Italy. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63. p. 211.

Zhang P, Vanderschuren H, Futterer J, Gruissem W 2005. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes. *Plant Biotechnology Journal*, 3. p. 385.

Study of Oxidative Profile of Transgenic Beans by Means of the HR-MAS NMR

ABSTRACT

In Brazil, beans are one of the most important food legume, is considered the main source of proteins in low-income populations. One of the major diseases affecting the common bean golden mosaic is transmitted by the whitefly, by BGMV viruses (Bean Golden Mosaic Virus). Thus, EMBRAPA rice and beans developed a genotype resistant to BGMV called Olathe 5.1. Two other genetically modified strains were produced (5.1 Treasury and Ivory 5.1). The ¹H NMR spectra HR-MAS led to the structures of the flavonoids quercetin and myricetin, present in higher concentration in genetically modified beans. Thus a study of the oxidative profile of these cultivars, where the flavonoid kaempferol has undergone a change in its content due to exposure to these genotypes physical uncontrolled conditions was conducted.

Keywords: Flavonoids; HR-MAS; Chemometrics.

Submissão: 22/10/2014
Aceite: 30/06/2015