

# Como produzir alimentos transgénicos com maior valor nutritivo

Marta Vasconcelos  
3º Ciclo FFUP  
4 Março 2010



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

**CBOQF**

Centro de Biotecnologia  
e Química Fina

**A melhor forma de evitar deficiências nutritivas é ter uma dieta variada, rica em vegetais, frutas e produtos animais**



A segunda melhor abordagem, especialmente para aqueles que não têm possibilidade de fazer uma dieta variada, é a de comer alimentos densos em nutrientes

## “Biofortificação”

Estratégia sustentável que visa aumentar teor em Zn, Vit A e Fe

# Biofortificação

## Fortificação:

- Enriquecimento de alimentos durante a **colheita** ou **processamento** de forma a aumentar o conteúdo nutricional

## Biofortificação:

- Utilização de variedades melhoradas que têm a capacidade de **absorver**, **repartir**, e/ou **sintetizar** maiores níveis de nutrientes durante o seu **crescimento**, de forma a que os produtos colhidos tenham conteúdos nutricionais mais elevados.

# Deficiência em micronutrientes

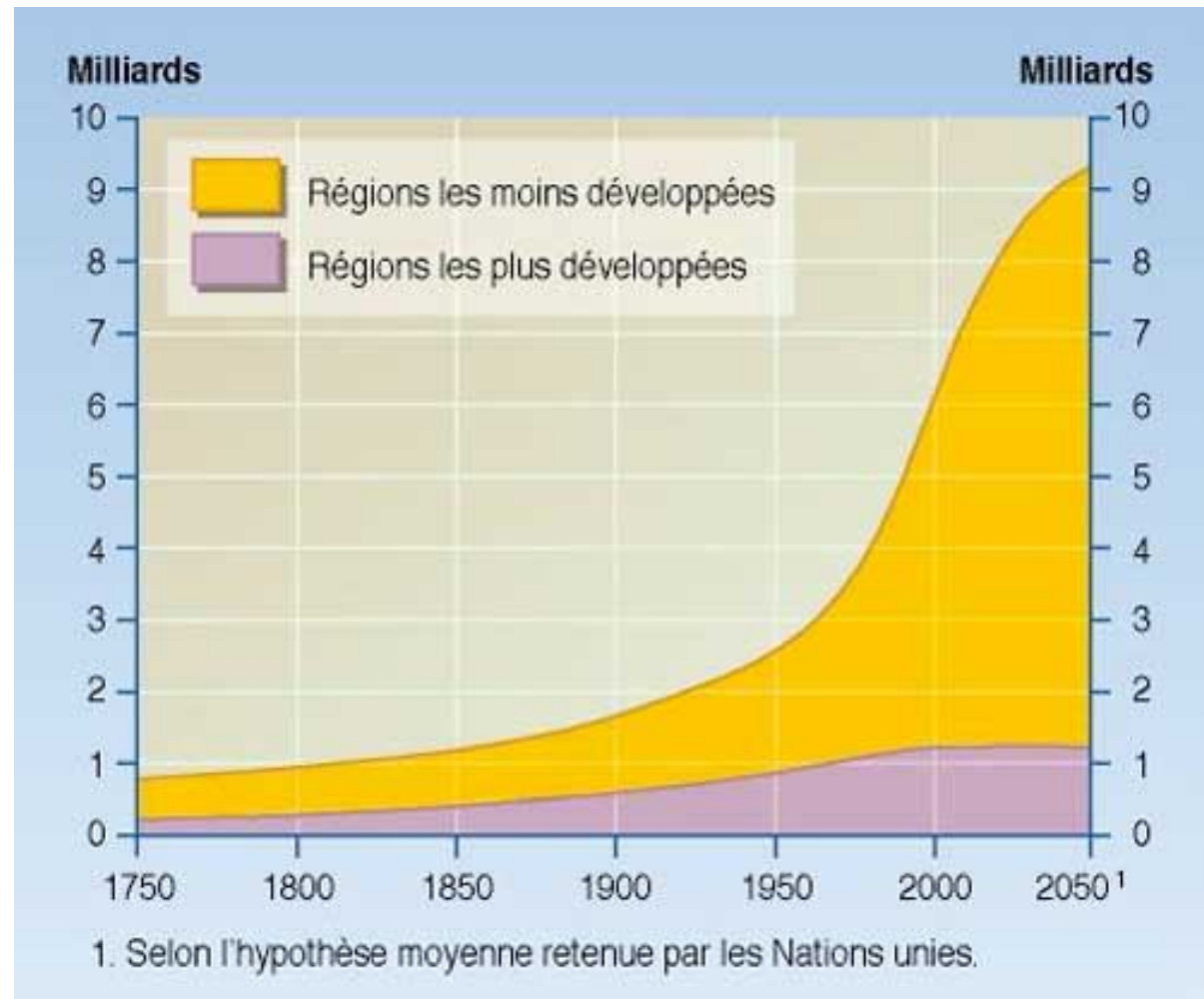
**Fe:** 33 a 50% da população em risco.

**Zinc:** ?????????? (mesmo que Fe?)

**Vitamina A:** 250 milhões pessoas com deficiência

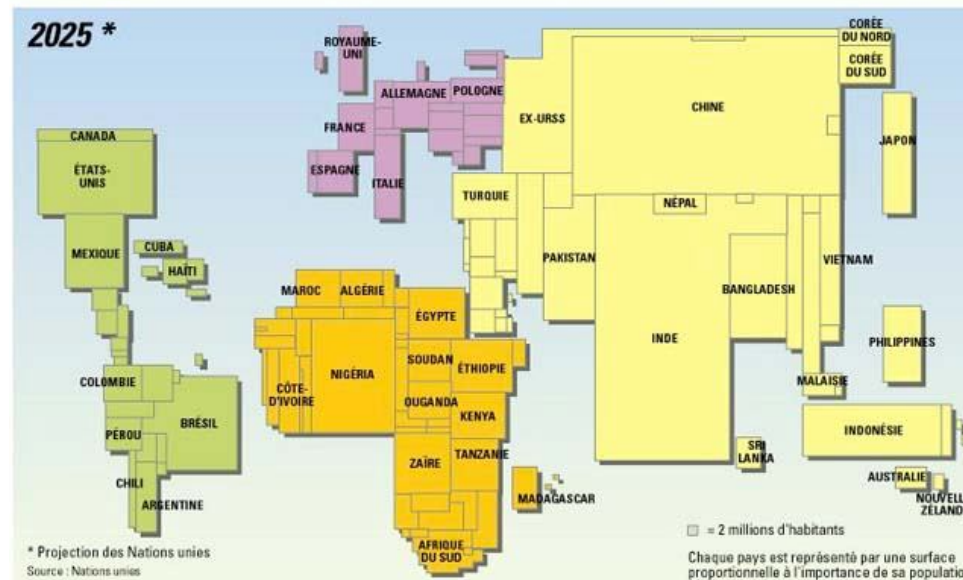
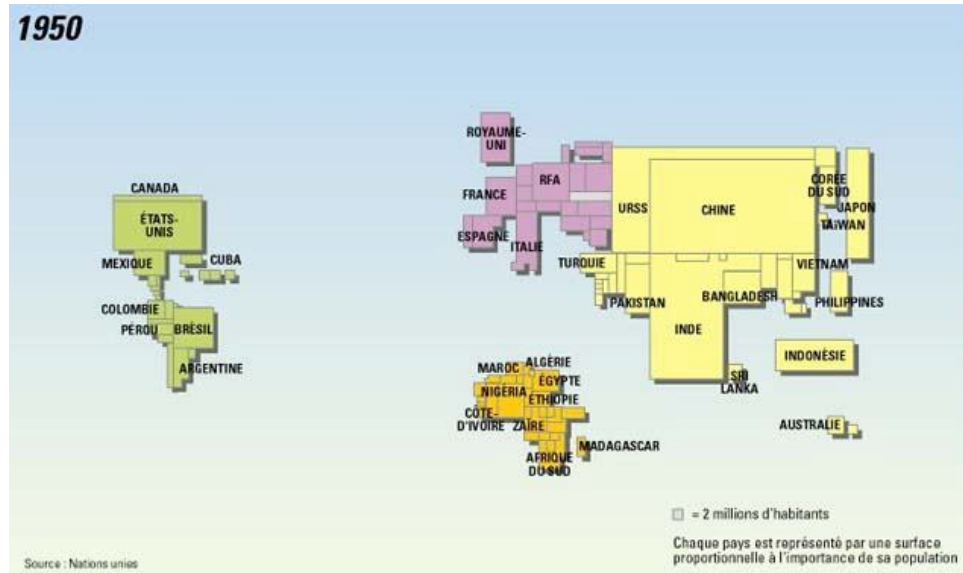
**Iodo:** 38% da população em risco

# Crescimento populacional: países desenvolvidos vs. países em desenvolvimento

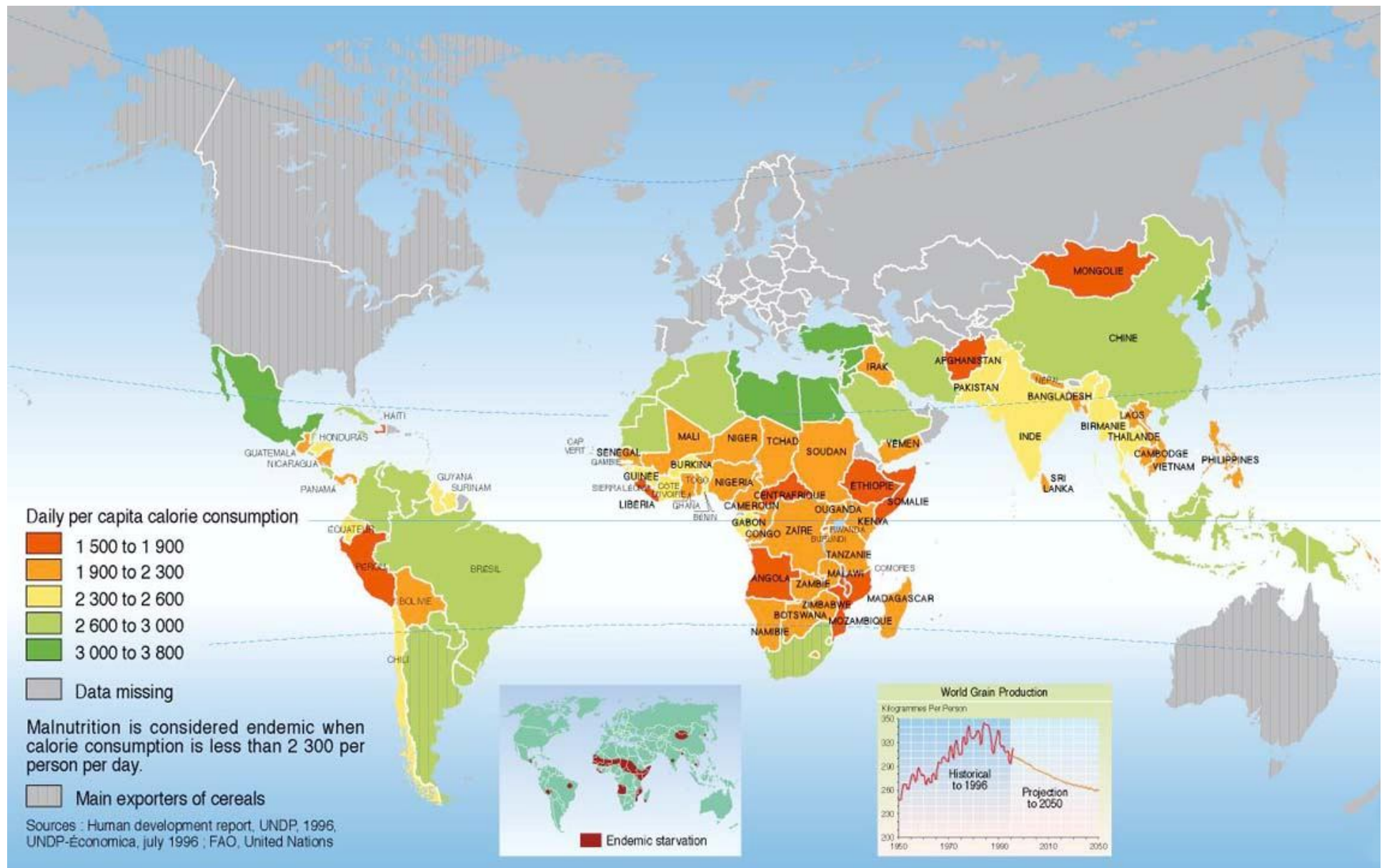


Source : *World population 1998, The World at Six Billion* (octobre 1999) et *World Population Prospects: The 2000 Revision*, (février 2001), Nations unies, Département des affaires économiques et sociales, Division de la population, New York.

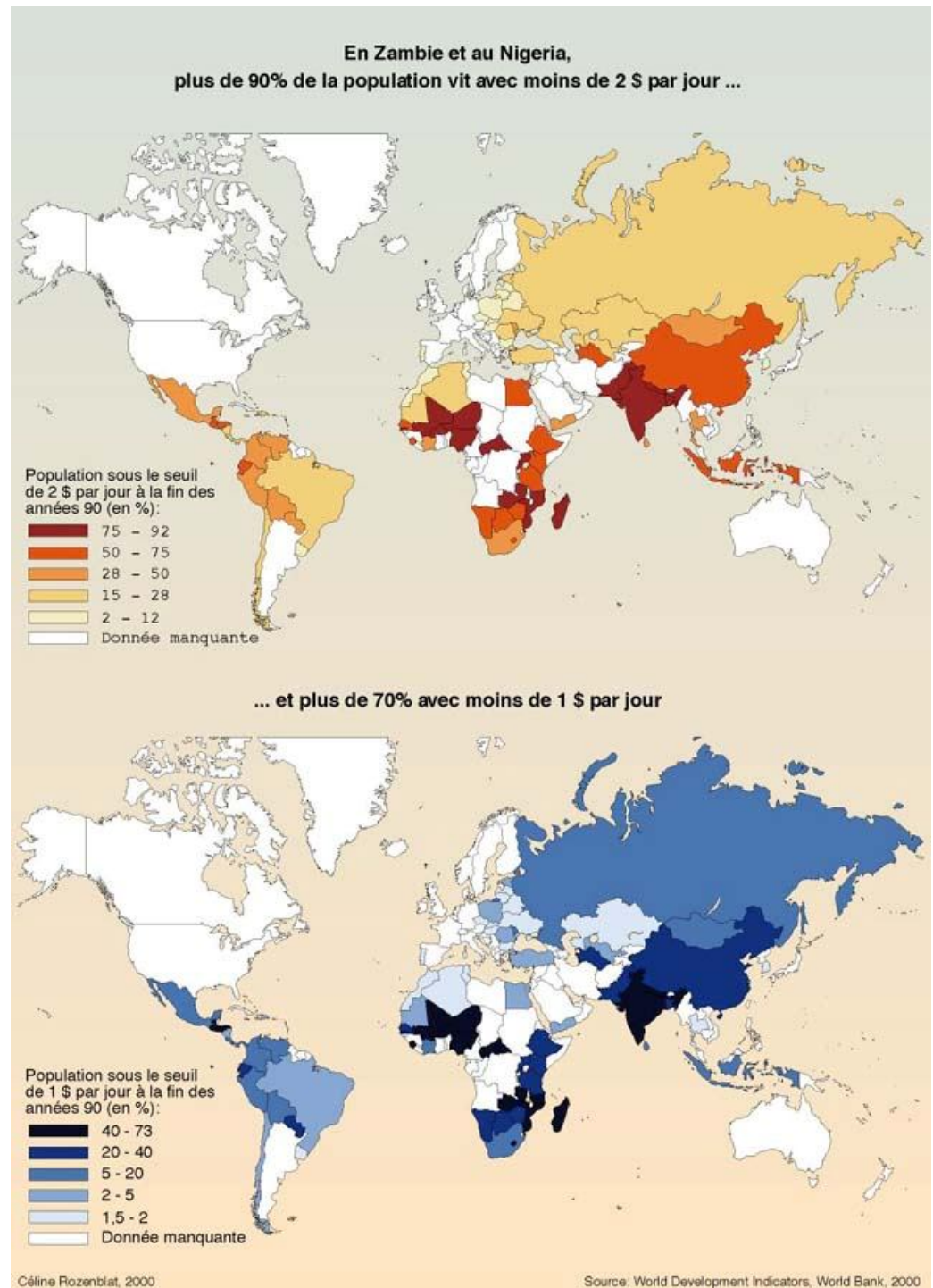
# População mundial, 1950 e 2025



# Consumo de calorias e fome no mundo



# Linha de probreza: % população que vive com menos de 2 e 1 USD por dia



# **Alimentos mais nutritivos**

**Hibridação convencional**

**Biodisponibilidade**

**Fortificação**

**Económico-social**

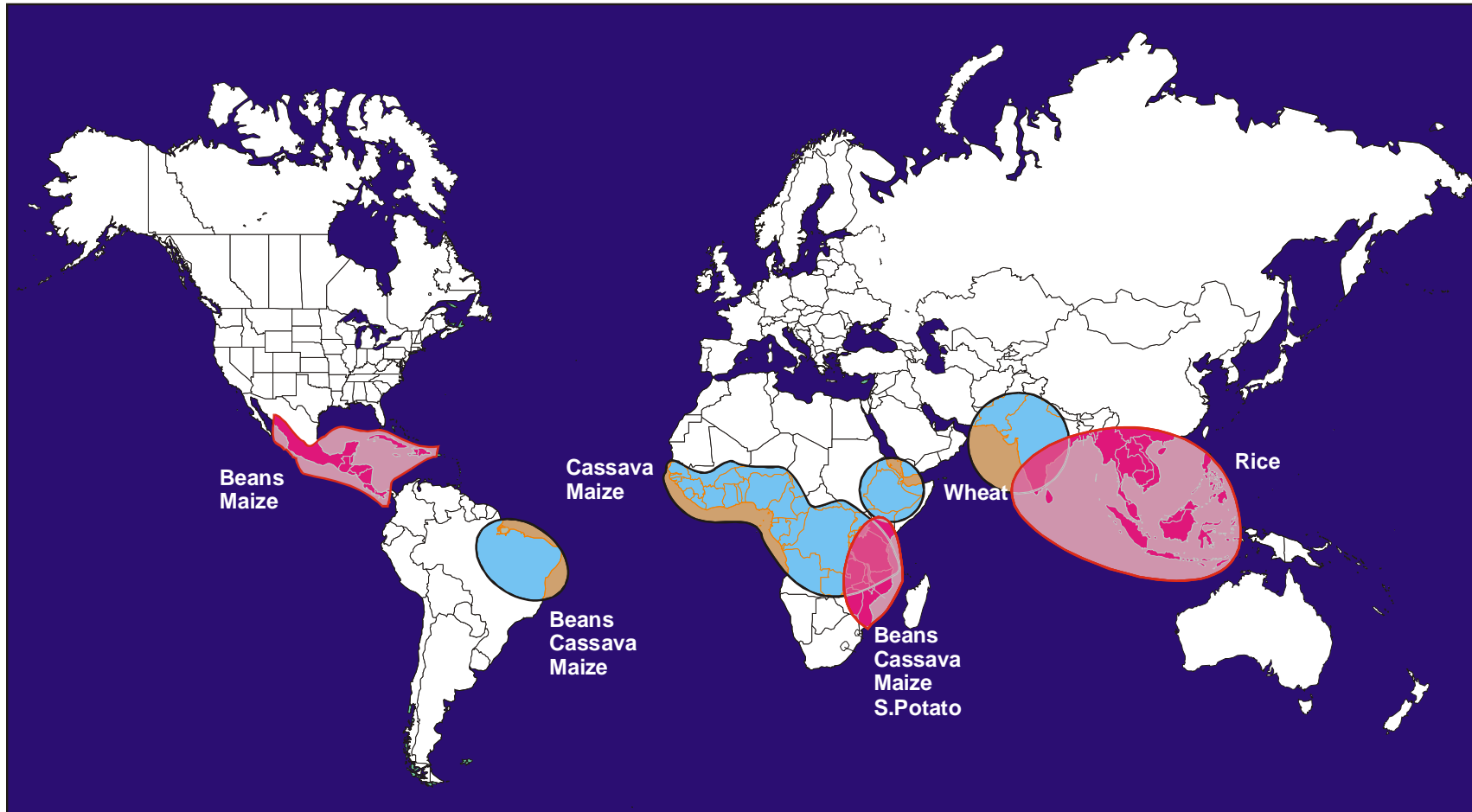
**Educação/disseminação**

**Genómica nutricional/engenharia genética**

# Alimentos base

	<b>Fe Conc. (mg/kg)</b>	<b>Zn Conc. (mg/kg)</b>	<b>Beta-caroteno (mg/kg)</b>
<b>Arroz integr.</b>	<b>6 - 25</b>	<b>14 - 59</b>	<b>0 - 1</b>
<b>Arroz polido</b>	<b>1 - 14</b>	<b>14 - 38</b>	<b>0</b>
<b>Trigo</b>	<b>10 - 99</b>	<b>8 - 177</b>	<b>0 - 20</b>
<b>Milho</b>	<b>10 - 63</b>	<b>12 - 58</b>	<b>0 - 10</b>
<b>Feijão</b>	<b>34 - 111</b>	<b>21 - 54</b>	<b>0</b>
<b>Cassava</b>	<b>4 - 76</b>	<b>3 - 38</b>	<b>1 - 24</b>

# Biofortificação: Impacto



Áreas regionais com impacto potencial

**Quais os processos  
metabólicos críticos e  
como podem ser  
manipulados para  
aumentar o conteúdo  
nutricional em alimentos  
vegetais?**

# Aquisição ferro raizes (Dicot)

**Apoplasto**

**Simplasto**

**Fe(III)-chelate**

**Reductase (FRO)**

$e^-$

**chelate**

**Transporter (IRT)**

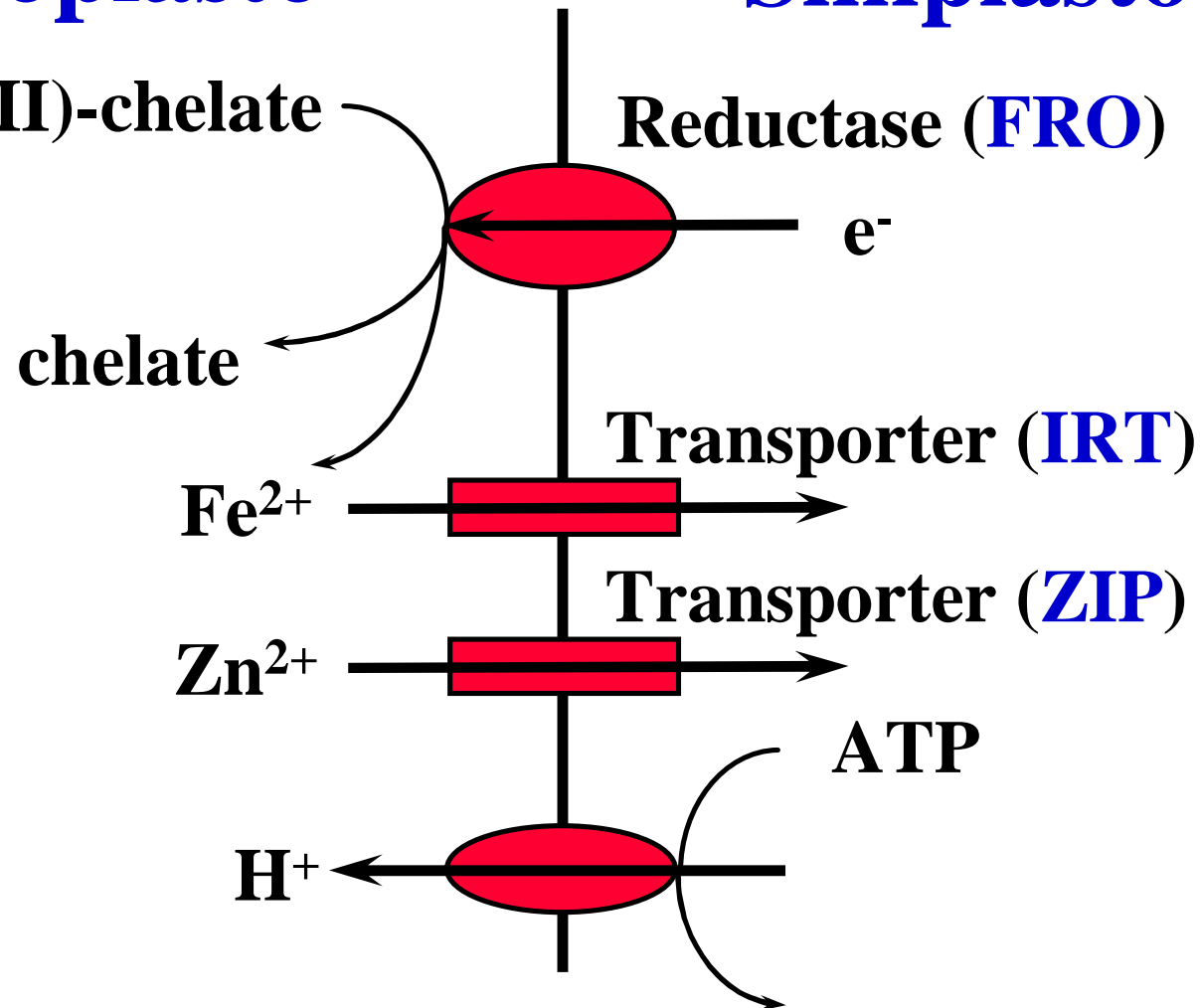
**Fe<sup>2+</sup>**

**Transporter (ZIP)**

**Zn<sup>2+</sup>**

**ATP**

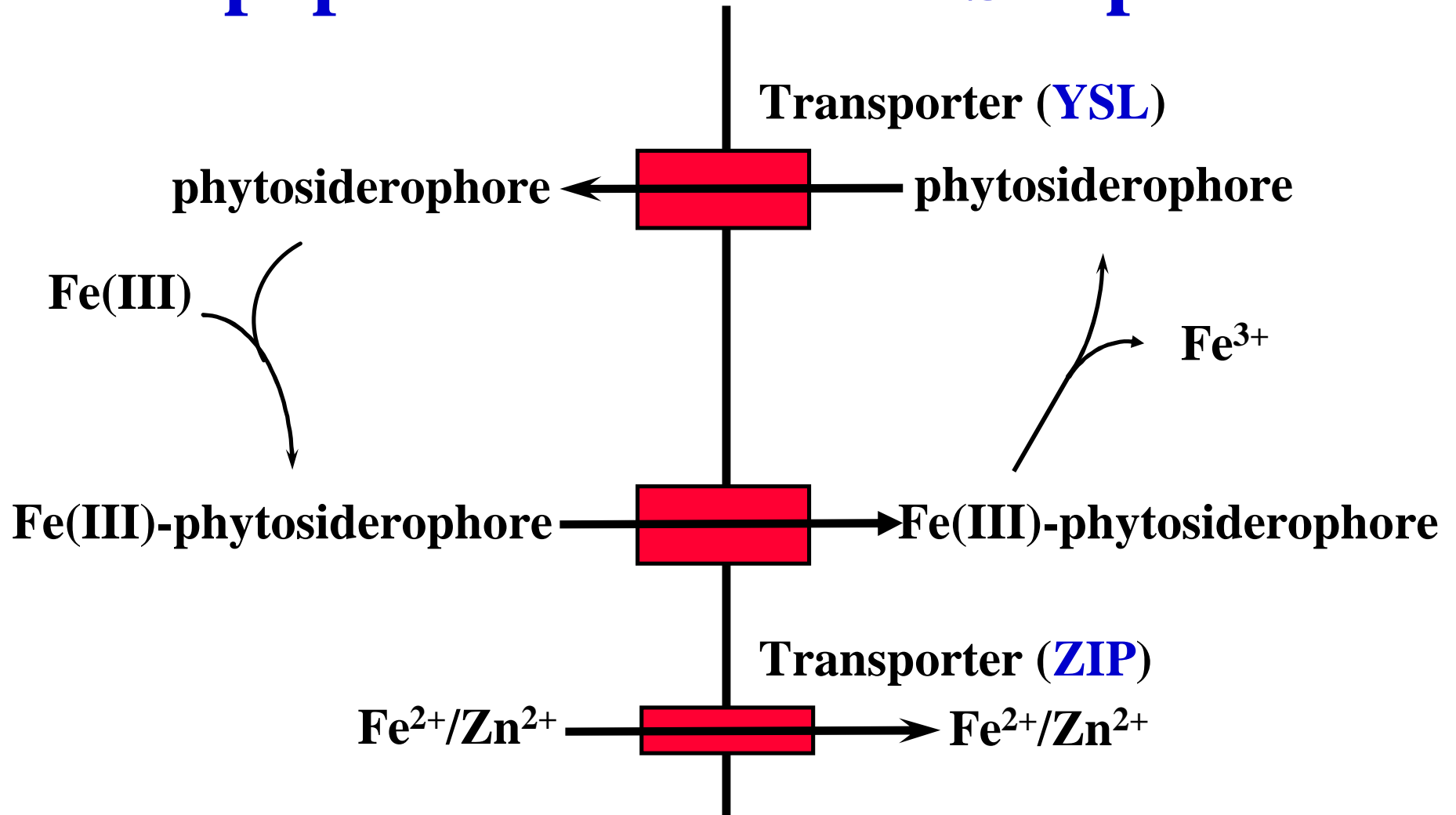
**H<sup>+</sup>**



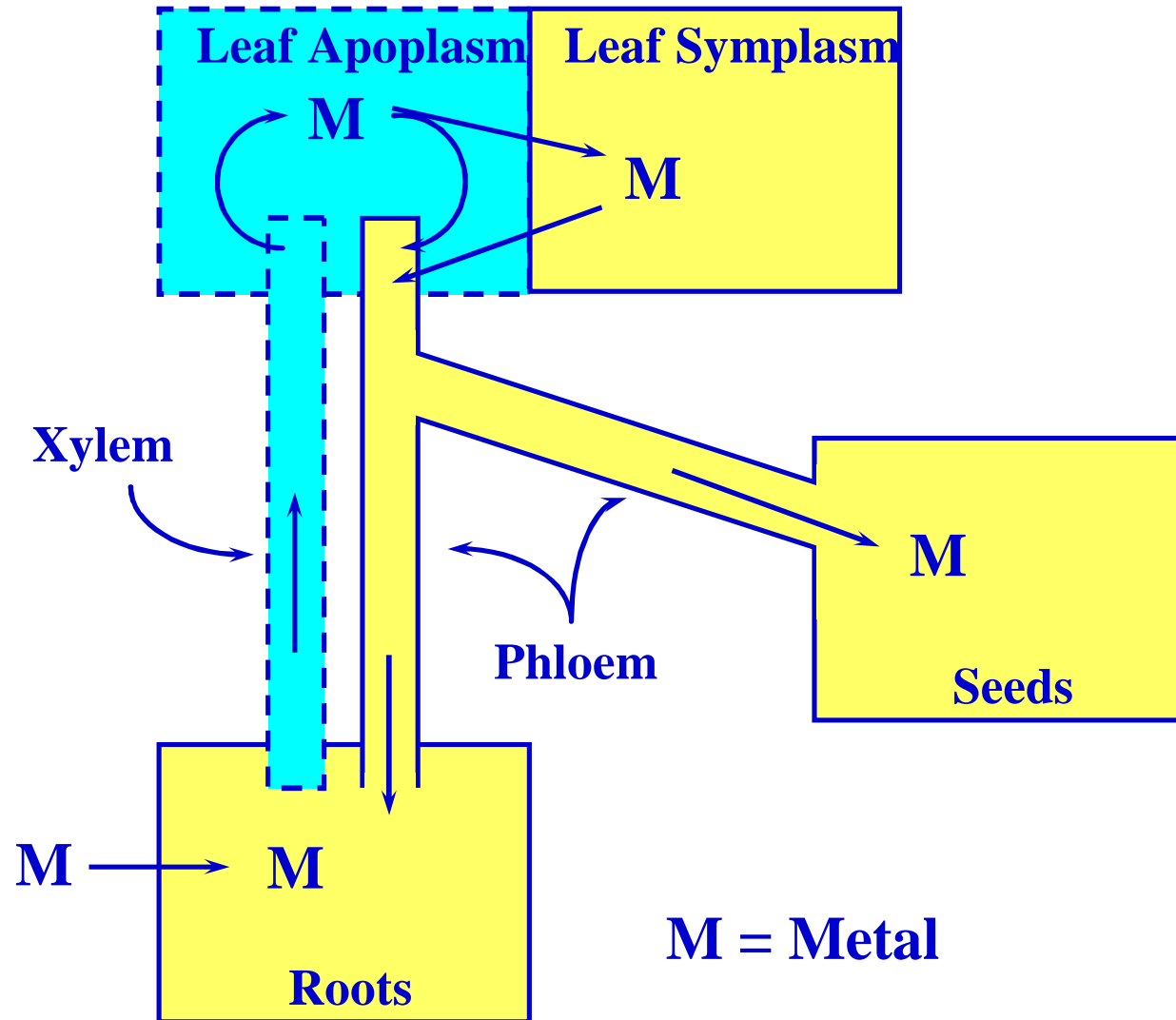
# Aquisição ferro raizes (herb)

**Apoplasto**

**Simplasto**



# Percursos de transporte mineral na planta



# Famílias de genes importantes nas plantas para nutrientes minerais

- **Biosynthetic genes**
  - Phytosiderophores, Nicotianamine
- **Divalent metal transporters**
  - ZIPs, NRAMPs, CE (cation efflux) family, etc.
- **Metal-chelate transporters**
  - YSL (Yellow-Stripe Like) family members
- **Metal storage**
  - Ferritin

# Alimentos transgênicos: alguns exemplos práticos

- Biofortificação de alimentos através da biotecnologia
  - Arroz com ferro
  - Arroz dourado
  - Soja (*Glycine max*)



## Aumento da concentração de ferro e zinco em arroz transgênico





# Arroz (*Oryza sativa* L.)

- **Alimento mundialmente mais consumido (2/3 da população)**
- **Cresce em muitos tipos de habitat**
- **Portugueses: Maiores consumidores europeus de arroz**





**O arroz modificou a cultura, a dieta, e economia de milhões de pessoas: o arroz é mais do que um alimento**

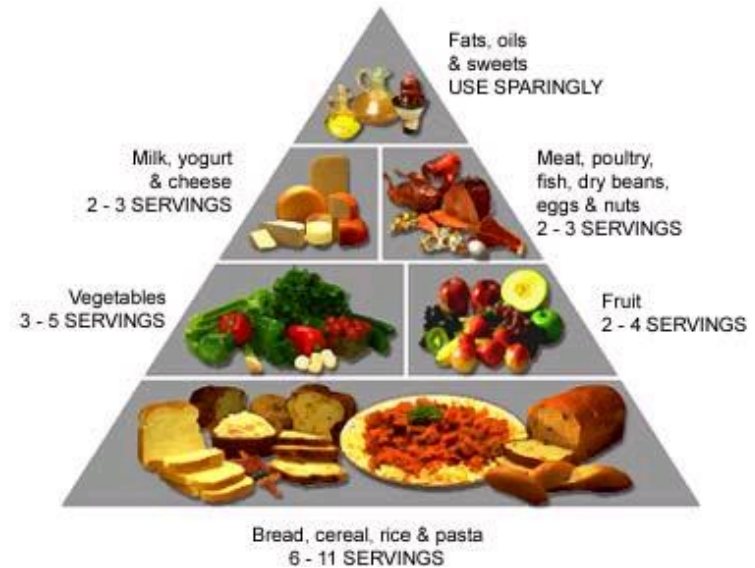




# Ferro

## Deficiência em ferro

Afecta **30%** da população mundial



**Maior carência nutricional mundialmente**



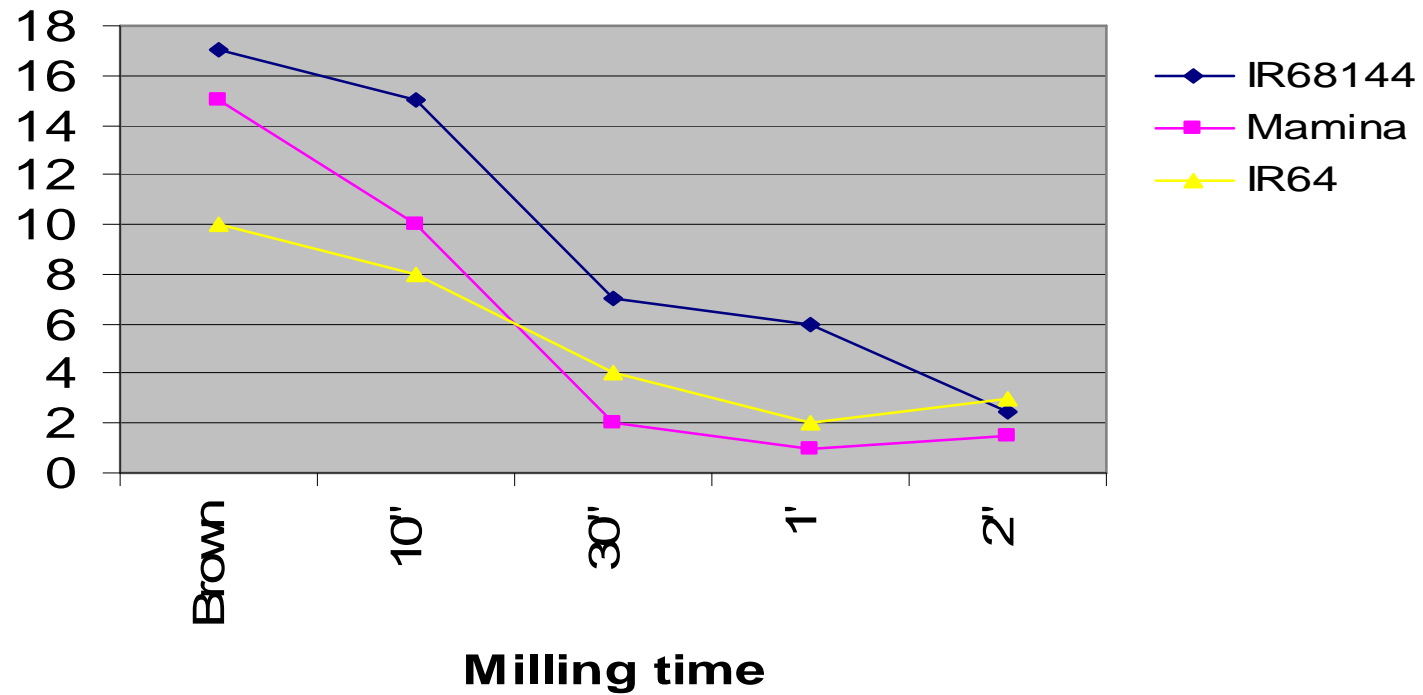
**Sintomas**

- Fadiga, fraqueza, falta de ar, palidez
- Redução das capacidades cognitivas
- Aumento do risco de morte durante gravidez



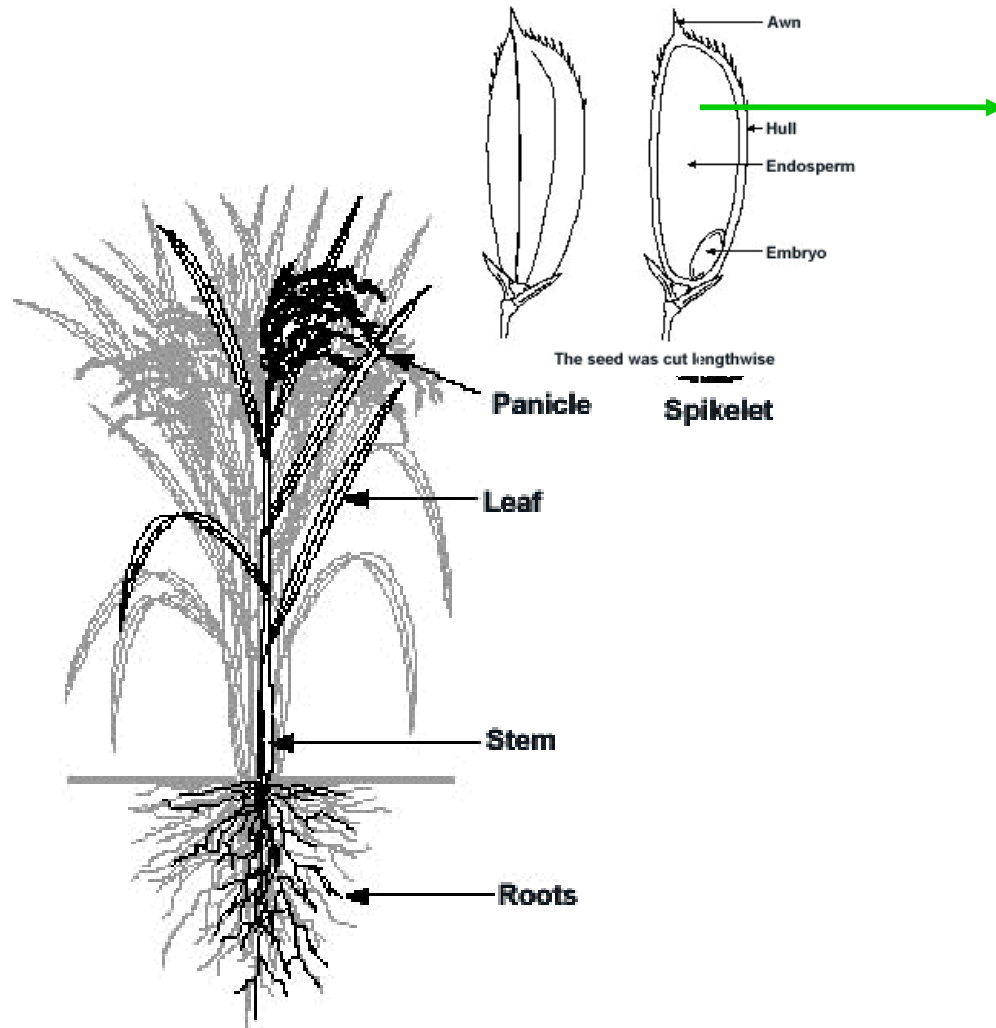
# O problema

- O grão de arroz é pobre em ferro





# O objectivo

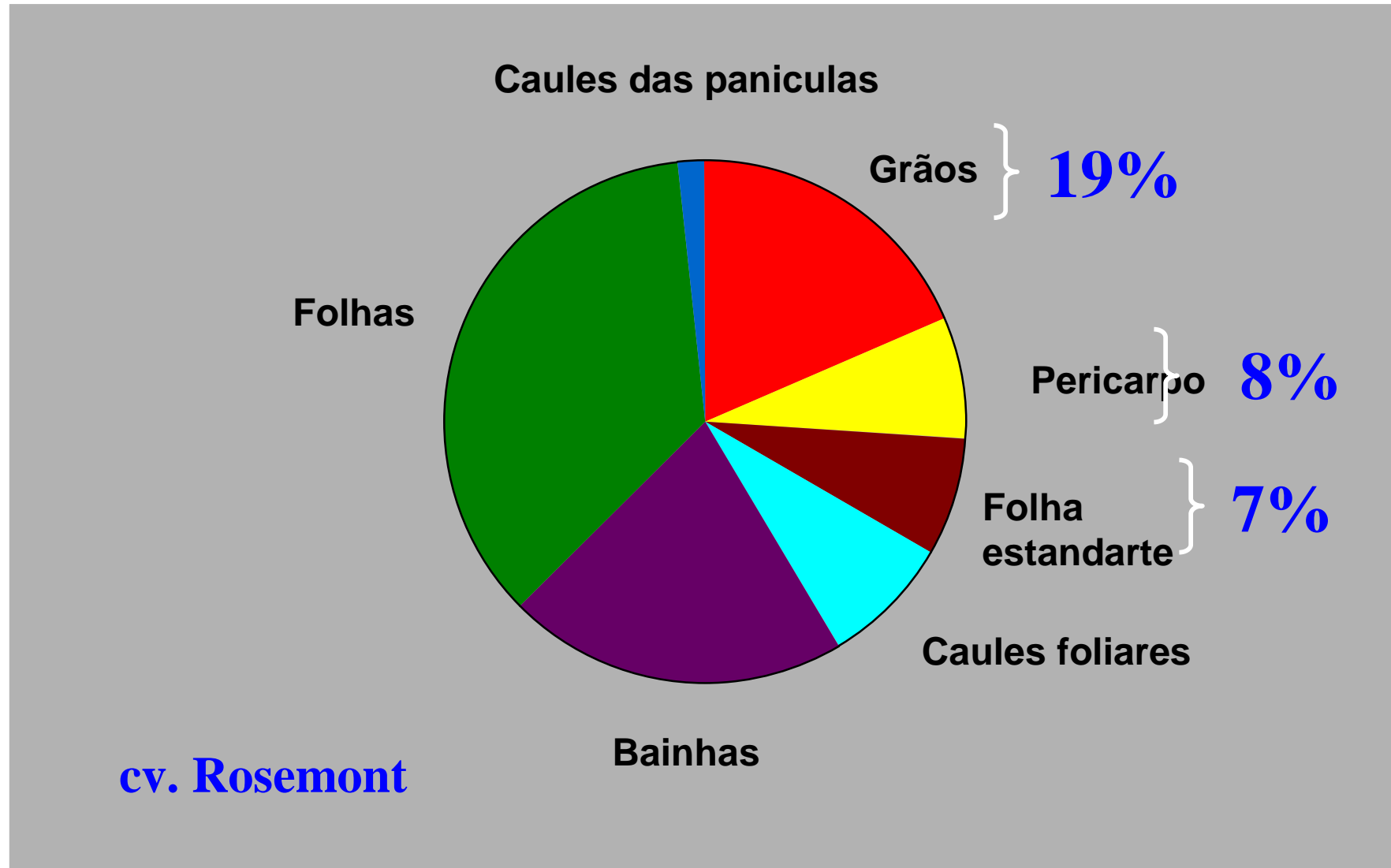


- Aumentar a nutrição em ferro

**Os minerais devem ser  
adquiridos do solo,  
transportados e acumulados  
nos tecidos comestíveis**



# Distribuição do ferro nas partes aéreas



# Transporte de nutrientes para as panículas



**Grão de arroz**

**Fluxo de nutrientes**

**Folha estandarte**

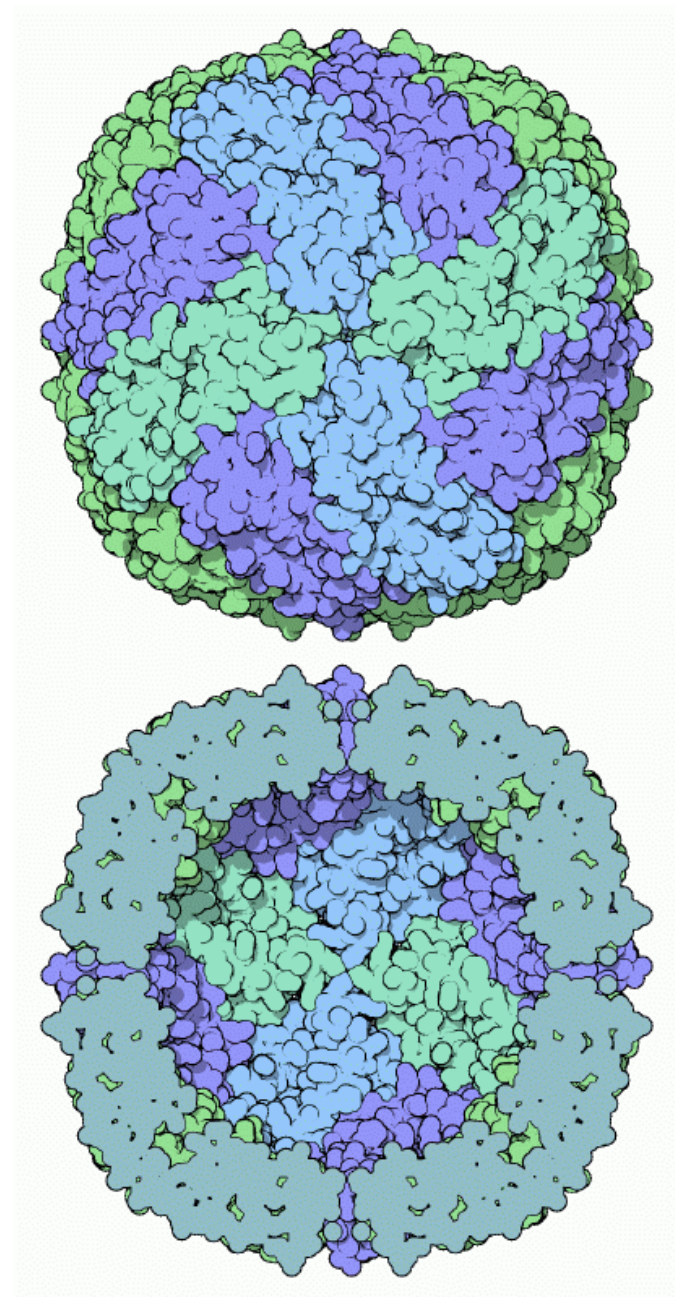
**O ferro é mobilizado para as sementes com os açúcares, amino ácidos e outros minerais.**



**Ferritina** : Acumula até **4500**  
**moléculas de ferro**

## **Estratégia ?**

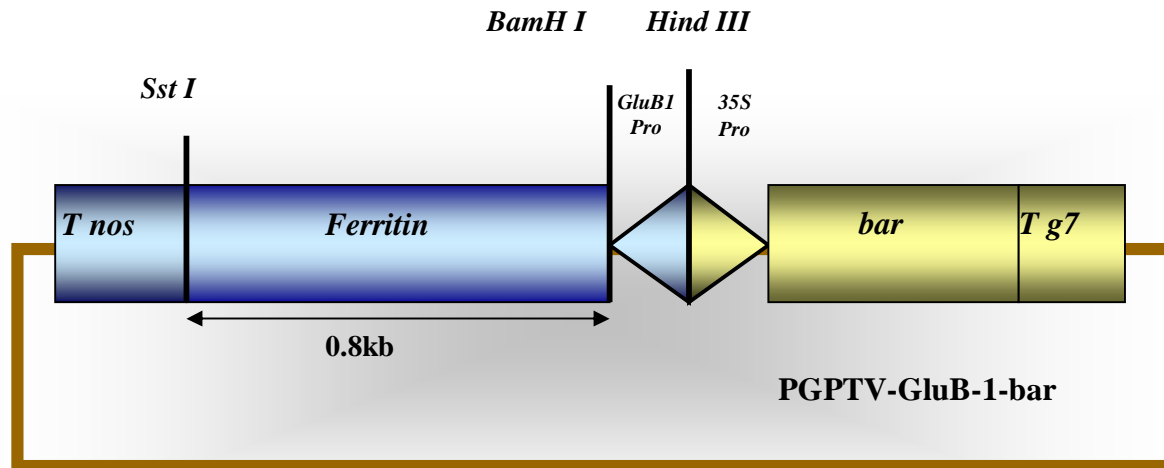
- 1. Identificar uma variedade**
- 2. Introduzir o gene da ferritina com promotor de endosperma**
- 3. Obter linhas homozigotas**
- 4. Analisar teor em micronutrientes**

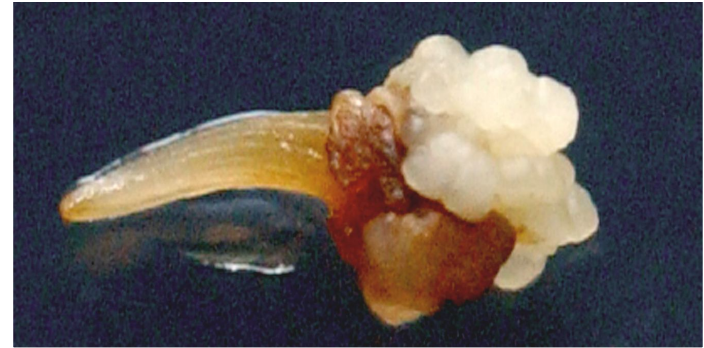
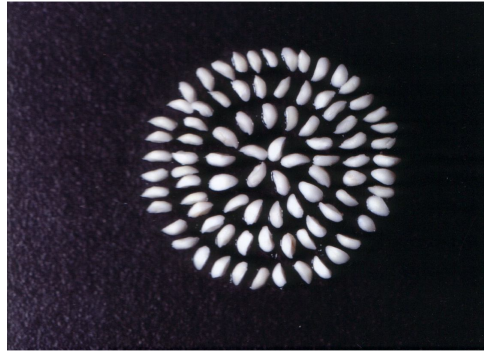




# Transformação

## Bombardeamento de partículas em embriões de arroz

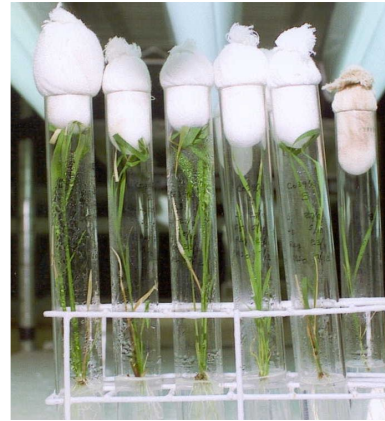




---

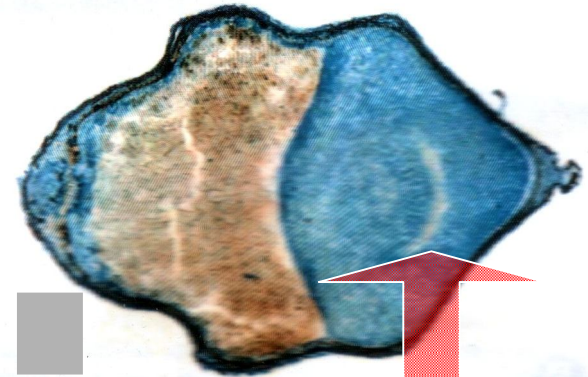
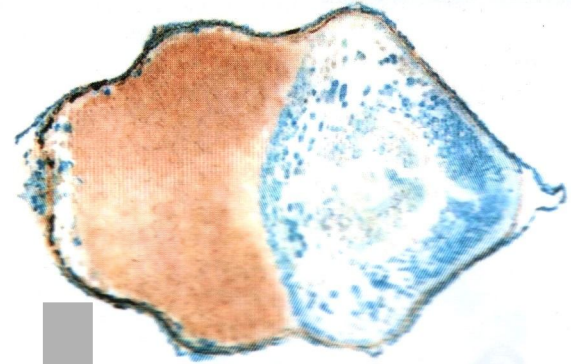
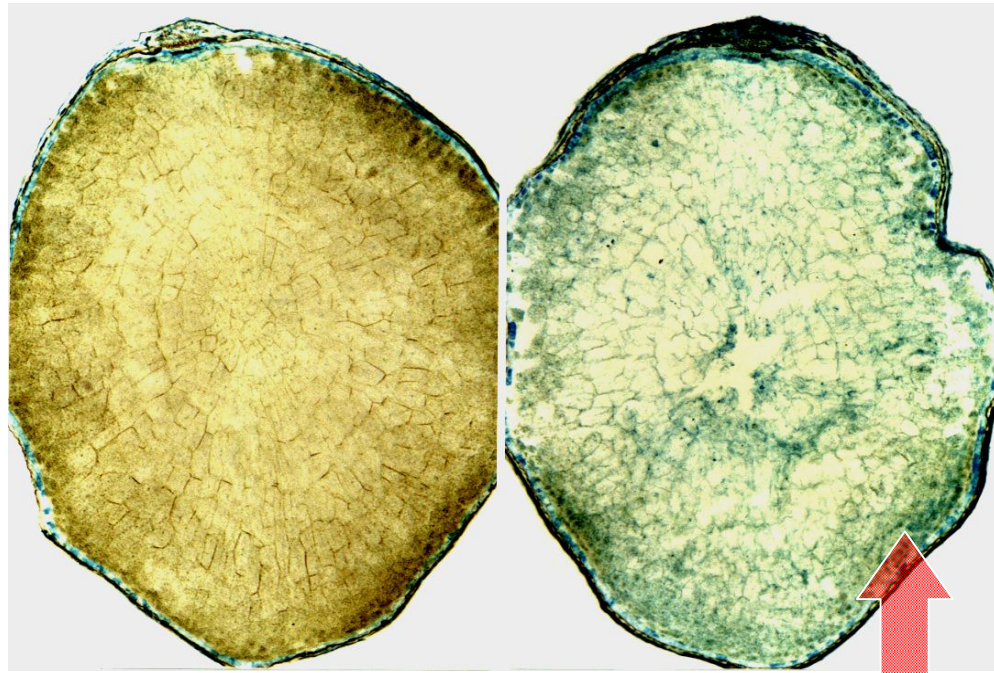
## Passos gerais na transformação genética do arroz

---





# Resultados



**Côr azul localiza o ferro**



# Resultados

- Arroz transgênico 3X mais rico em ferro e zinco, mesmo depois de polimento comercial dos grãos
- O ferro neste arroz é biodisponível
- Este material pode colmatar deficiências nutricionais graves, especialmente em países em desenvolvimento- e.g. Moçambique

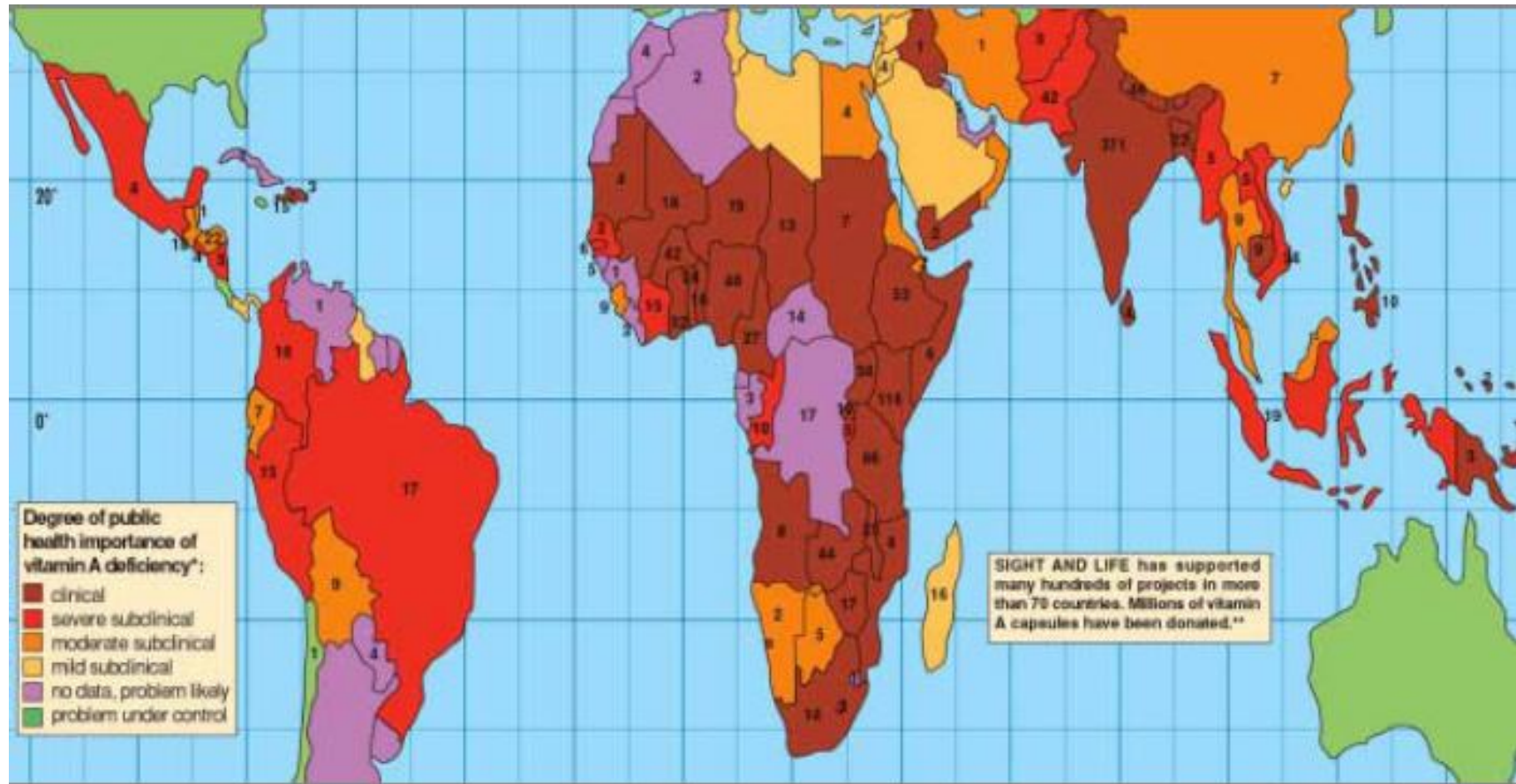


# Arroz dourado



“Todos nós precisamos de vitamina A, mas as crianças são as mais susceptíveis à sua deficiência. O RDA para crianças dos 1-3 anos é de 300  $\mu$ g por dia. Fornecer metade desta quantidade manteria um nível saudável desta vitamina no sangue.”

# Deficiência em Vitamina A



Fertilidade

Crescimento ósseo

Hematopoiese

Visão

Resposta imune

Embriogénese

...

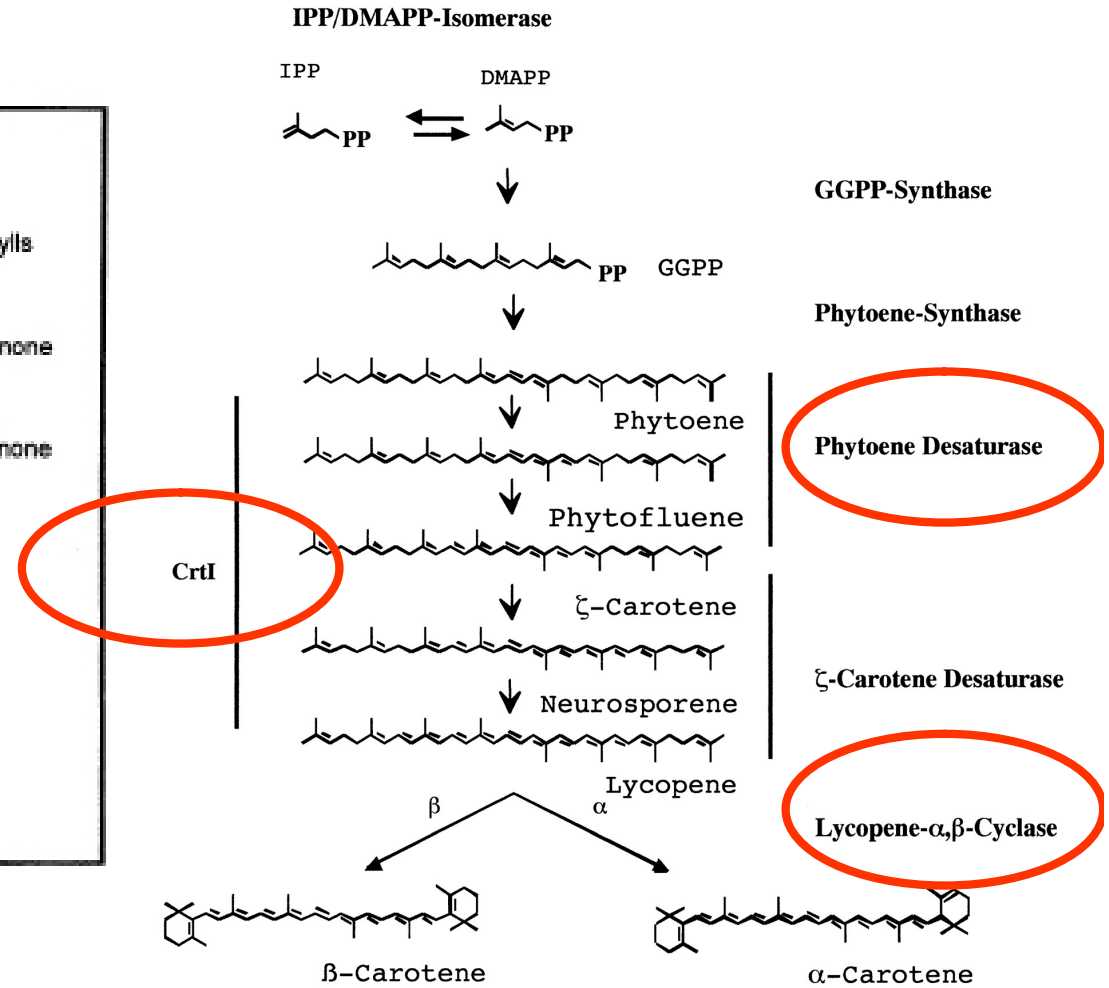
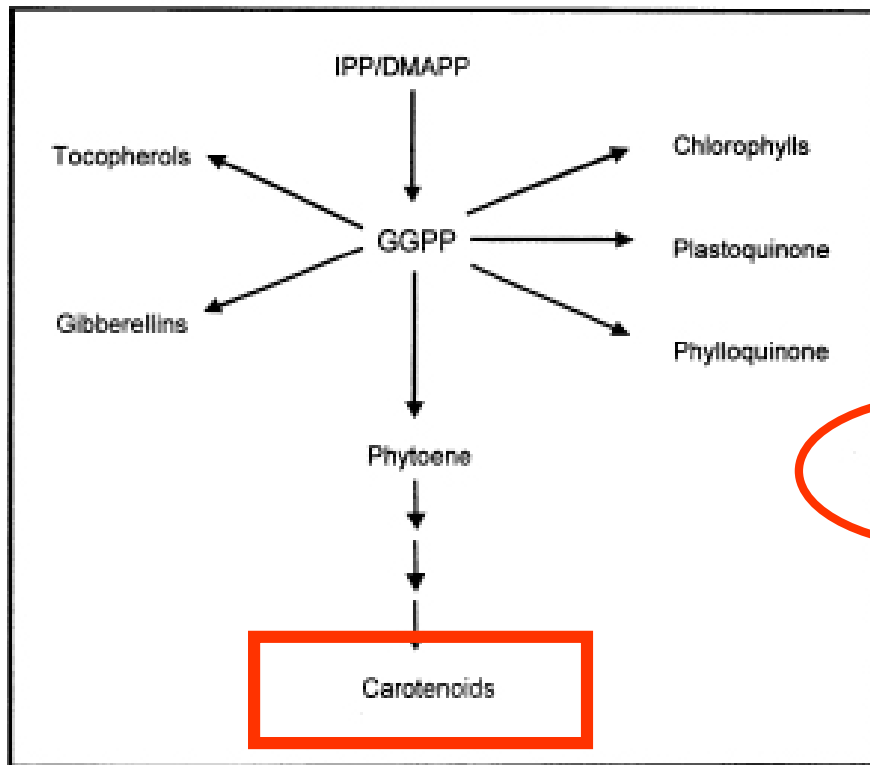


# Arroz dourado

- Arroz: não produz  $\beta$ -caroteno (provitamina A) naturalmente, apenas nos tecidos verdes.
- Apesar dos genes estarem presentes na semente, alguns estão “desligados” durante o desenvolvimento
- Em sociedades que consomem muito arroz, a falta de Vit A reflecte-se em cegueira, susceptibilidade para doenças e morte infantil prematura



# A estratégia



# Arroz dourado 1

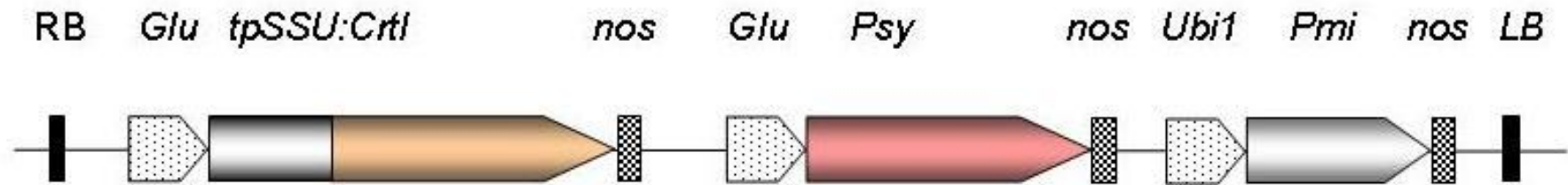
1.6  $\mu\text{g/g}$





# Arroz dourado 2

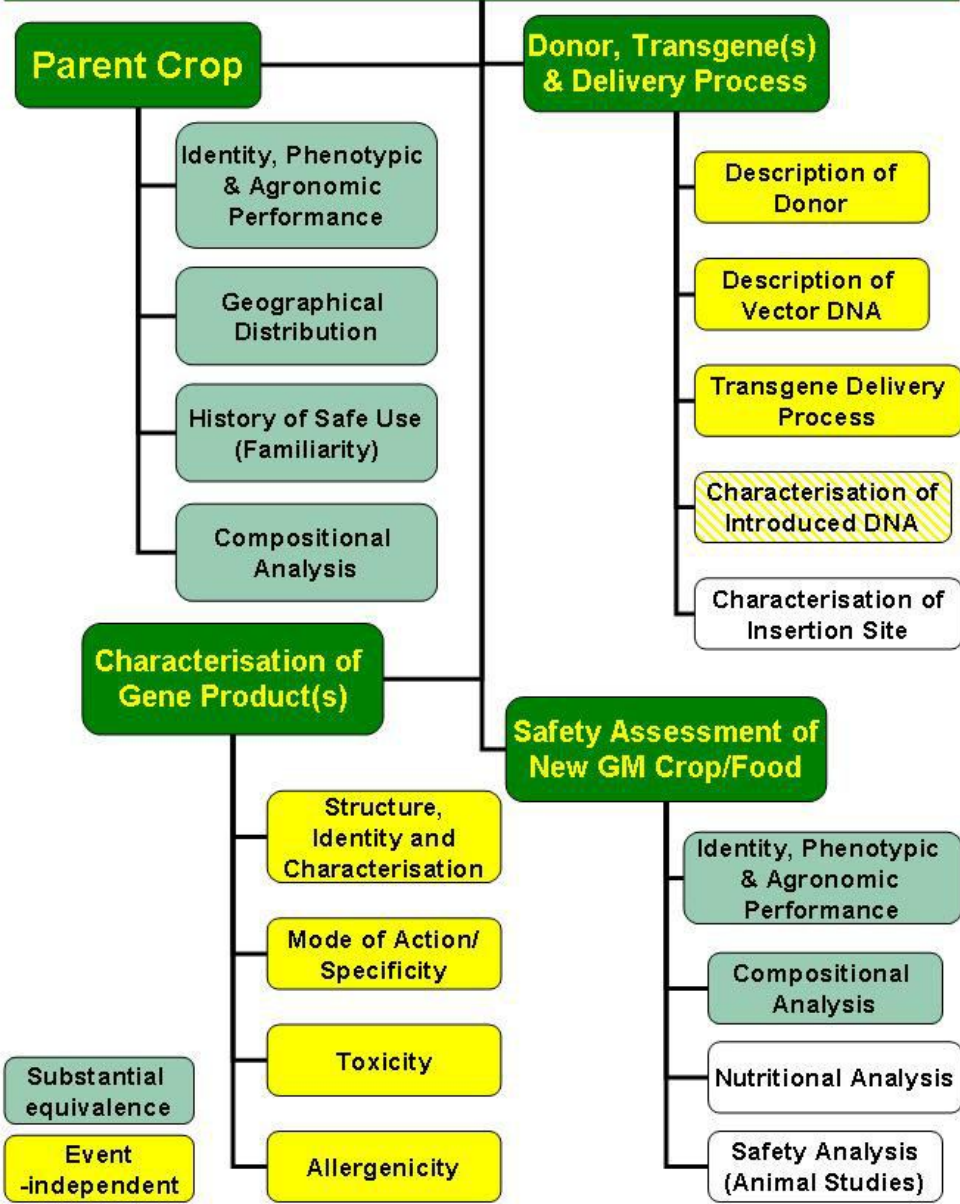
37  $\mu\text{g/g}$





<http://www.goldenrice.org/index.html>

# Safety Assessment of GM Food





# Implicações

O RDA de vitamina A para uma criança de 1-3 anos é **300  $\mu\text{g}$**

$\frac{1}{2}$  do RDA seria fornecido por 72 g da nova geração de arroz dourado

*O arroz dourado será fornecido aqueles que dele precisam sem custos associados*





## **Aumento nutricional em soja transgênica com gene *AtFR02***

# Leguminosas

- Ricas em ferro, vitaminas e proteínas



# Nutrição da soja

- 14% Água
- 15% HC solúveis
- 15% Fibra
- 38% Proteína
- 18% Lípidos (Nos EUA, 80% do consumo)



A soja é boa fonte de Fe, Ca, Zn, P, Mg, B, vitaminas e ácido fólico

# Soja (*Glycine max.*)

- China: 2838 A.C.
- Arroz, trigo, cevada e centeio
- França: 1740 D.C.
- Inglaterra: 1790 D.C.
- Estados Unidos: séc. XIX
- Fonte essencial de proteína e óleos, tanto na produção animal (preto e castanho) como na alimentação humana (amarelo e verde), com múltiplas aplicações.



# Utilizações da soja

## Utilizações alimentares

- Grão
- Tofu
- Miso
- Farinha
- Pão
- Doces
- Ração
- Bolachas
- Tartes
- Café
- Manteiga
- Leite
- Rebentos
- Óleo
- (...)

## Utilizações alternativas

- ⌋ Lápis
- ⌋ Plásticos
- ⌋ Tintas
- ⌋ Têxteis
- ⌋ Biodiesel
- ⌋ Insecticidas
- ⌋ Papel
- ⌋ Borrachas
- ⌋ Cosméticos
- ⌋ Agentes anti-corrosivos
- ⌋ Espumas anti fogo
- ⌋ Isolamento eléctrico
- ⌋ Agente controlador de poeiras
- ⌋ Sabonetes/Shampôs
- ⌋ (...)

# Os problemas

1. Cresce mal em solos deficientes em ferro (30% do solo mundial)
2. Baixa absorção do ferro limita a quantidade que vai para os grãos

# Aquisição ferro raizes (Dicot)

**Apoplasto**

**Simplasto**

**Fe(III)-chelate**

**Reductase (FRO)**

$e^-$

**chelate**

**Transporter (IRT)**

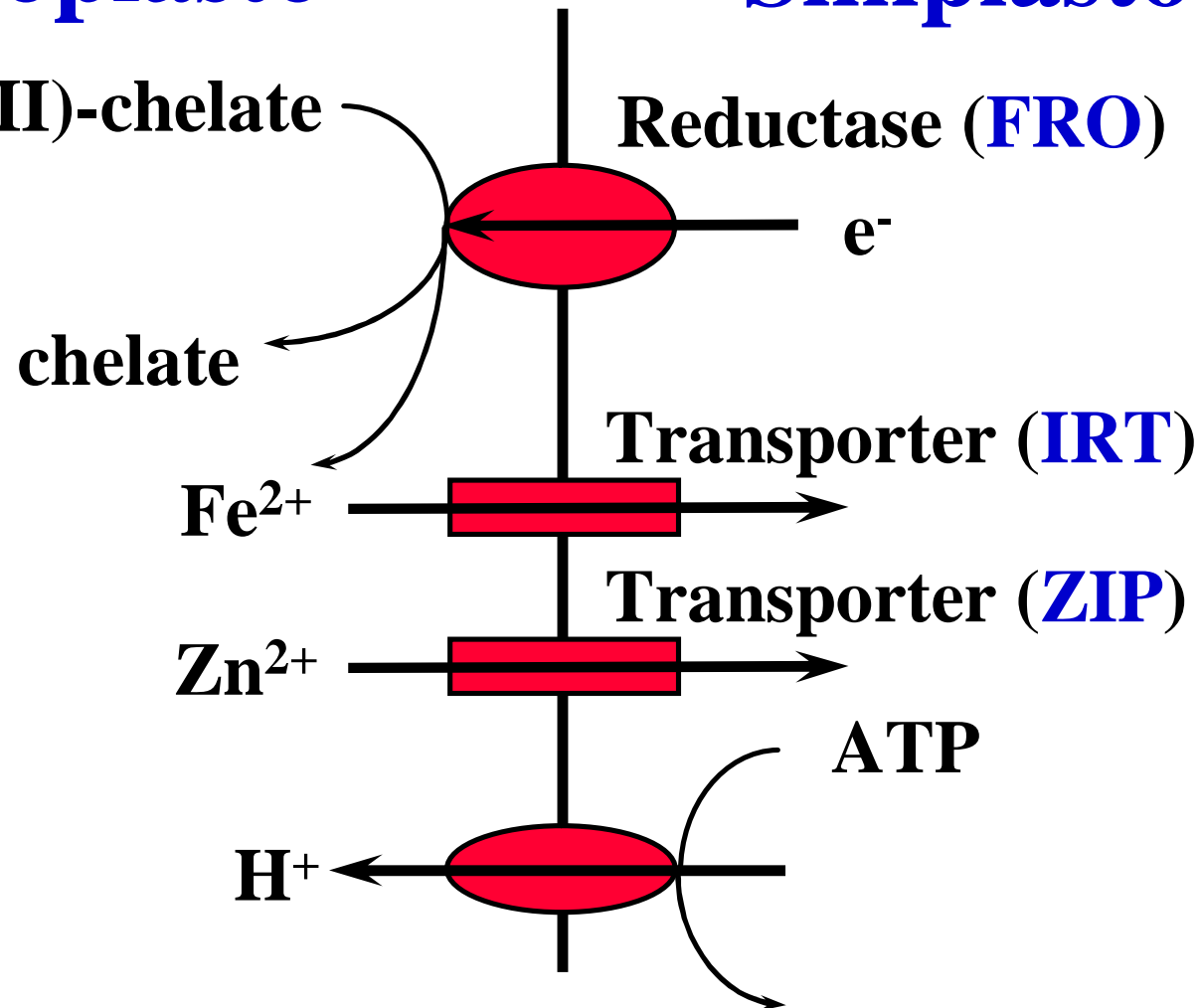
**Fe<sup>2+</sup>**

**Transporter (ZIP)**

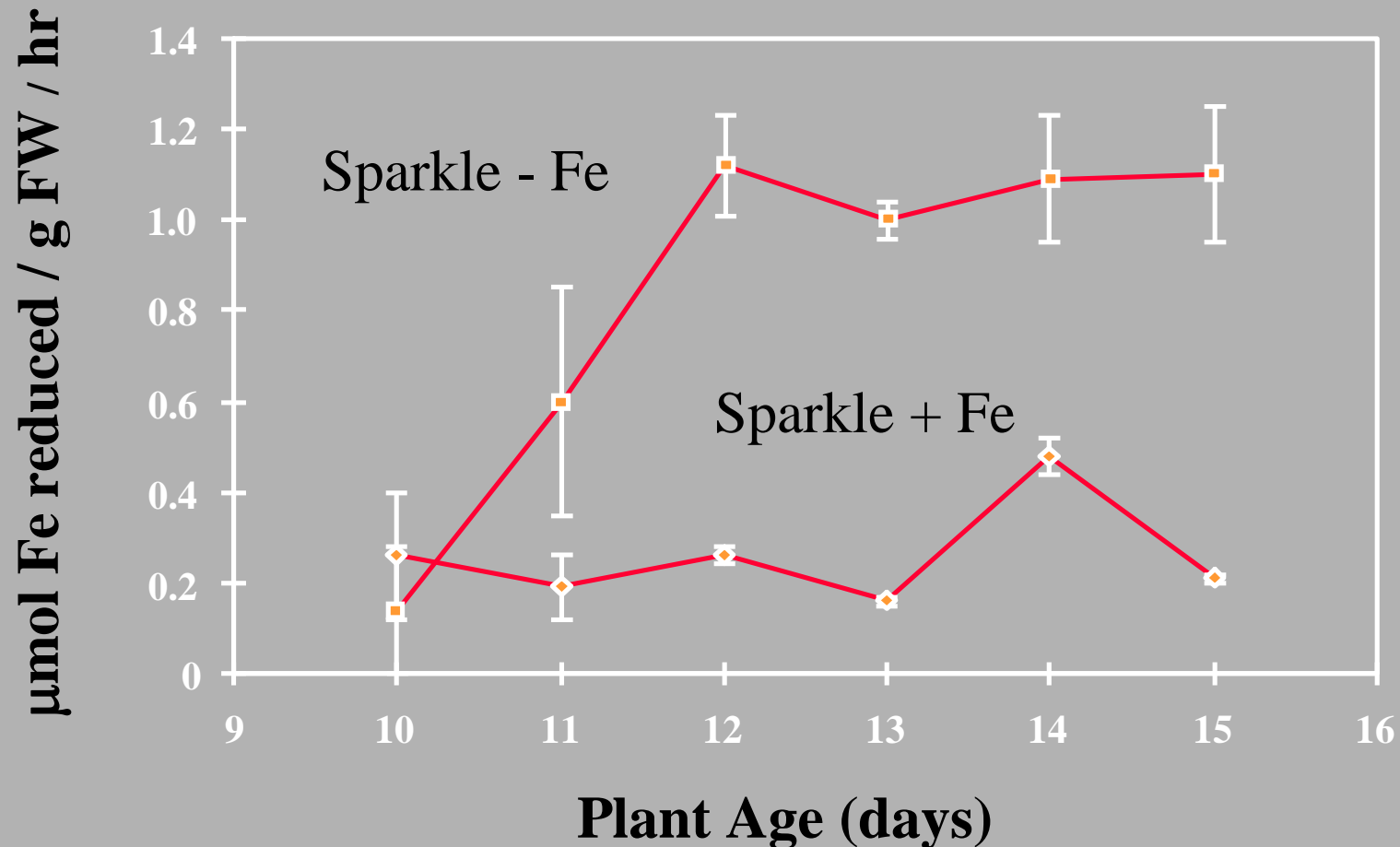
**Zn<sup>2+</sup>**

**ATP**

**H<sup>+</sup>**



# A deficiência em ferro regula a actividade da reductase



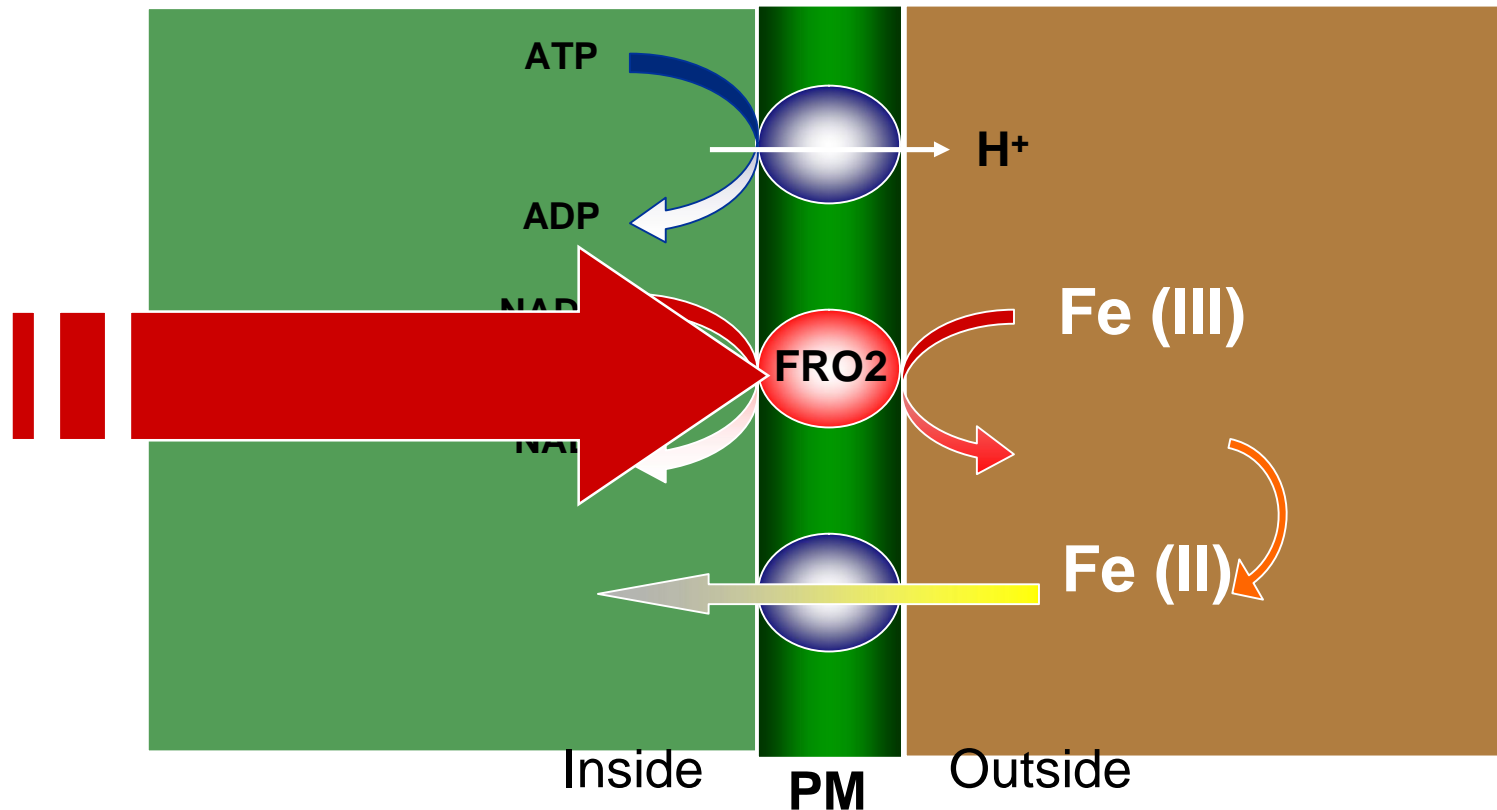
# Objectivo

- Aumentar a absorção e acumulação de ferro na soja



# Estratégia

- Utilizar gene *AtFRO2* com um promotor constitutivo

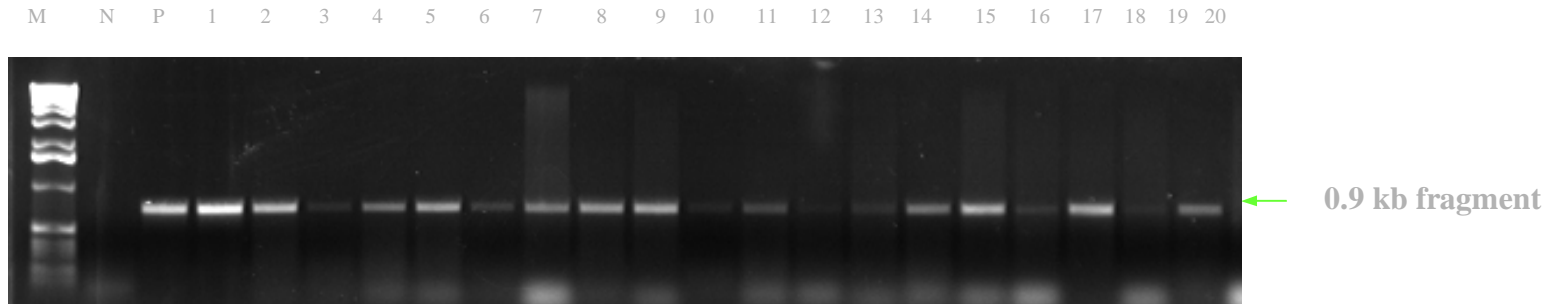


# Materiais

38 linhas transgênicas de soja com o gene *AtFRO2* (2 genótipos parentais)



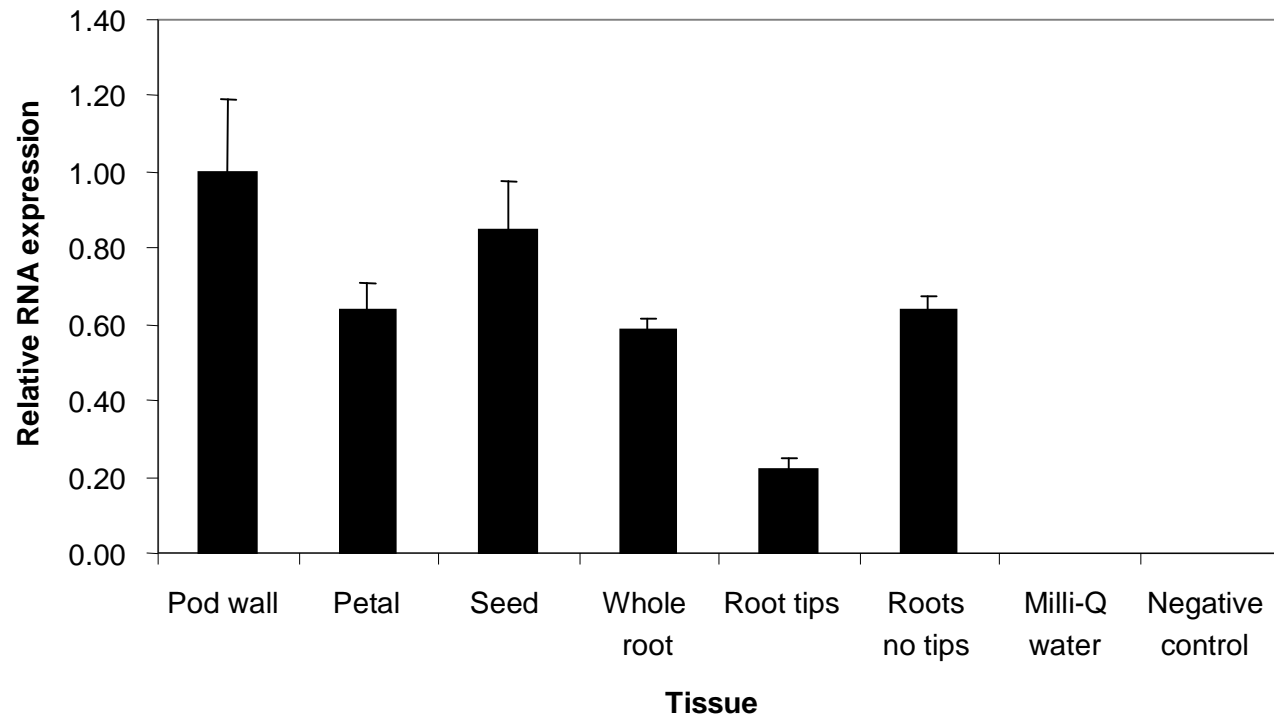
# ✓ screening PCR para identificação de linhas transgênicas homozigotas



# ✓ Q-RT-PCR para quantificação de expressão

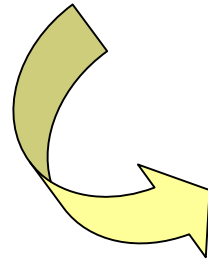
# Resultados:

*AtFRO2* RNA expression in different plant tissues



# Métodos

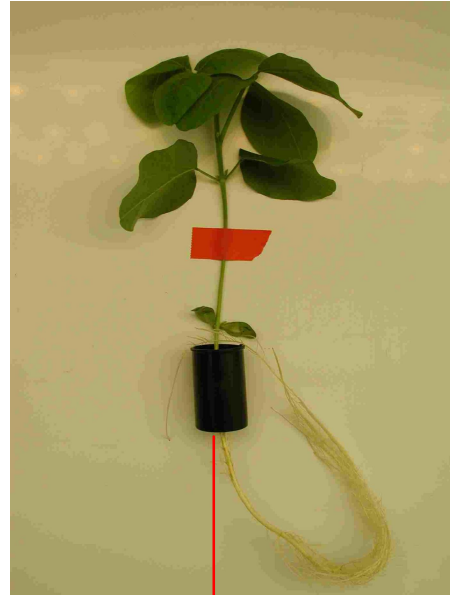
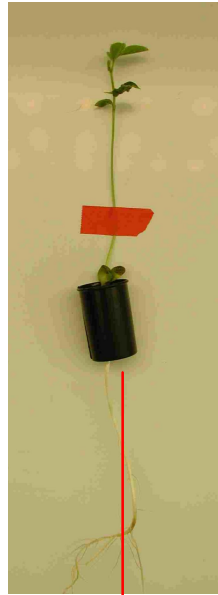
**Ensaio solúvel para quantificação de actividade reductora** com setup específico



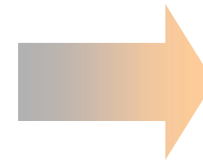
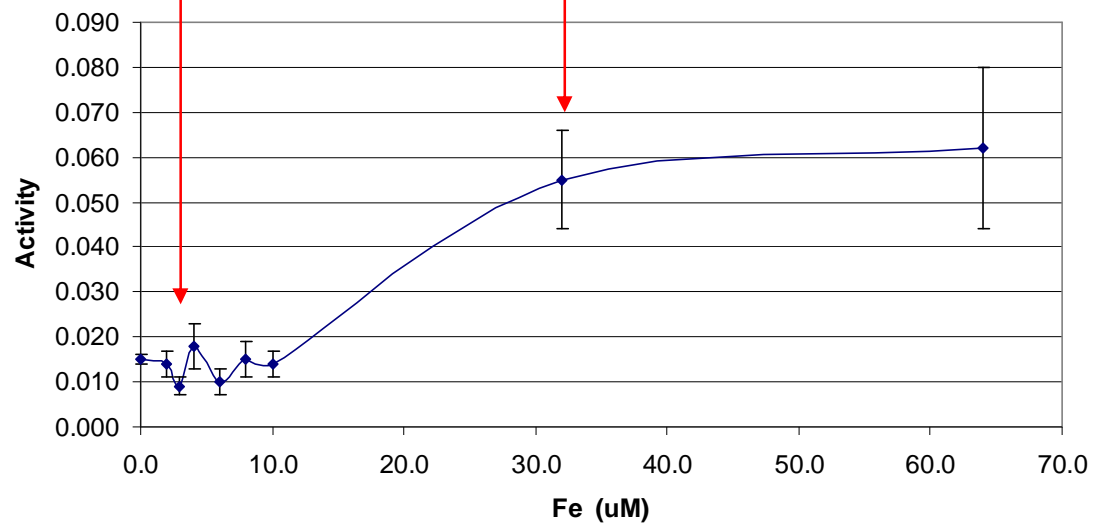
Actividade  
reductora:

$$\frac{\text{Av. Abs}_{535} \times \text{Vol. Sol}/1000}{0.02214 \times \text{Root FW} \times \text{Assay min}/60} = \mu\text{mol Fe/ g FW h}$$

# ✓ Actividade redutora de ferro em soja controle



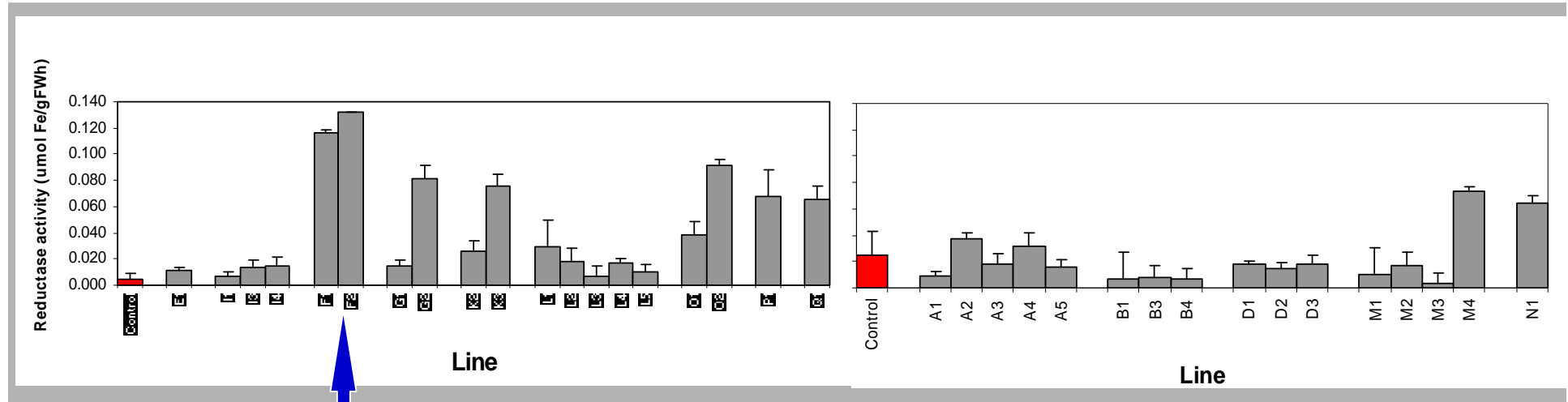
Soybean-Thorne



**Actividade  
baixa**

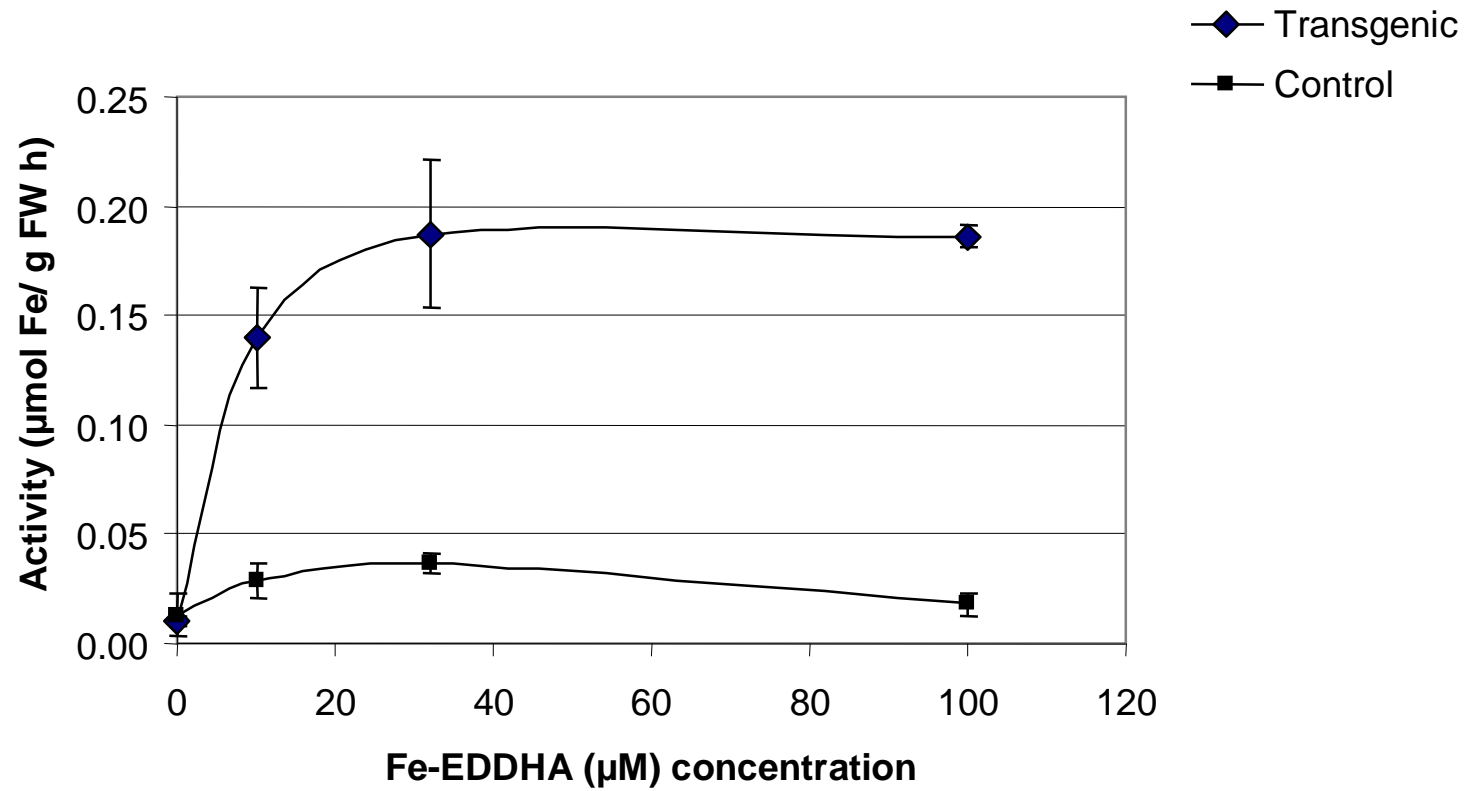
**E nas plantas  
transgênicas com  
AtFRO2?**

# Actividade redutora de linhas individuais



**Linha 392-3 apresentou actividade  
23 X mais elevada que controlo**

# Resultados

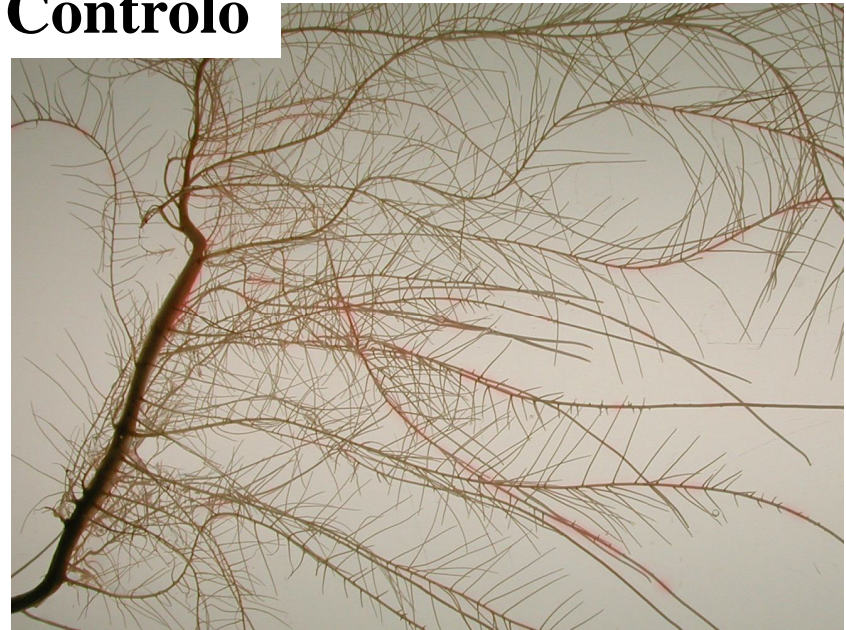


# Localização da actividade redutora

**Transgénica**



**Controlo**



# Análise de Fe

- Crescer plantas 14 d hidroponicamente a 0, 10, 32 e 100  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA
- Recolher folhas, raízes, sementes, cascas, caules e quantificar minerais por ICP-OES

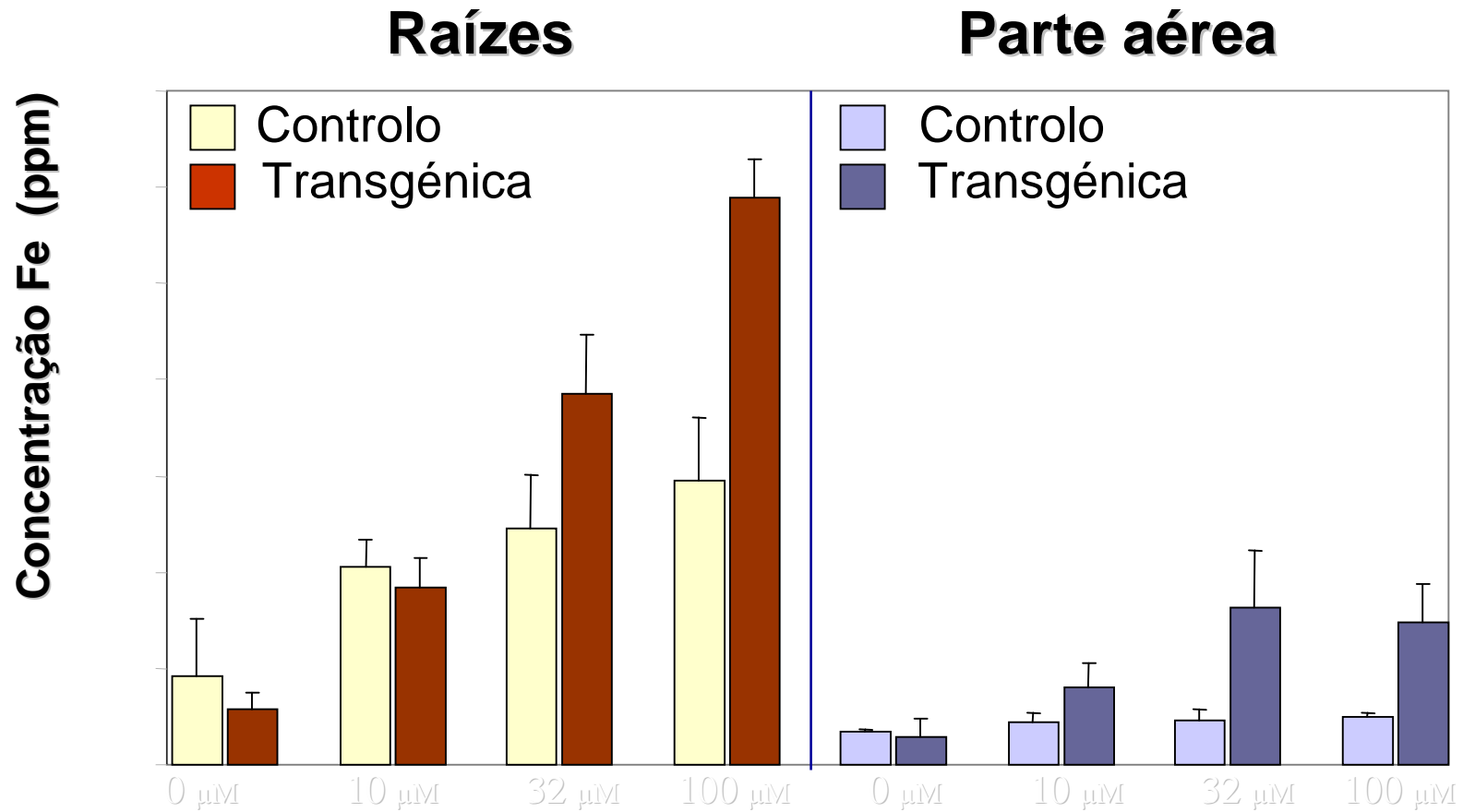
Digestão em triplicado com ácido nítrico e perclórico

Solubilizar em 0.2 M ácido nítrico

Analisar



# Aumento do teor em Fe



# Nutrientes nos tecidos

Mineral ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Folhas		Raízes		Caules	
	392-3	<i>Wt</i>	392-3	<i>Wt</i>	392-3	<i>Wt</i>
<b>Fe</b>	<b>766 ± 31**</b>	196 ± 8	<b>582 ± 25**</b>	201 ± 11	<b>94 ± 6**</b>	41 ± 3
<b>Mn</b>	<b>188 ± 8**</b>	65 ± 2	<b>258 ± 13**</b>	122 ± 10	<b>258 ± 13**</b>	122 ± 10
<b>K</b>	<b>30575 ± 1306*</b>	27244 ± 389	<b>51266 ± 2875*</b>	46430 ± 7979	<b>46004 ± 2467*</b>	33692 ± 2556
<b>P</b>	<b>6912 ± 105*</b>	4658 ± 34	<b>17490 ± 880*</b>	12284 ± 738	<b>6106 ± 393*</b>	4558 ± 195
<b>Zn</b>	<b>283 ± 6**</b>	136 ± 3	<b>346 ± 11**</b>	100 ± 4	<b>149 ± 9**</b>	56 ± 3

# Nutrientes no xilema

Mineral ( $\mu\text{M}$ )	392-3	<i>Wild-type</i>
Fe	98 $\pm$ 5	86 $\pm$ 20
Mn	2.9 $\pm$ 0.5**	0.9 $\pm$ 0.3
K	9606 $\pm$ 560*	7395 $\pm$ 463
P	1303 $\pm$ 165*	596 $\pm$ 75
Zn	178.05 $\pm$ 34*	88.54 $\pm$ 8

# Fe nas sementes

Fe ( $\mu\text{M}$ )	Folhas		Pericarpo		Sementes		
	Wt	392-3	Wt	392-3	Wt	392-3	
I	10	241 $\pm$ 13	379 $\pm$ 32**	59 $\pm$ 7	69 $\pm$ 2	90 $\pm$ 2	94 $\pm$ 2
	32	260 $\pm$ 14	287 $\pm$ 35	74 $\pm$ 6	61 $\pm$ 2	93 $\pm$ 1	104 $\pm$ 2**
	100	430 $\pm$ 34	734 $\pm$ 106*	58 $\pm$ 4	125 $\pm$ 3***	105 $\pm$ 7	116 $\pm$ 1**
II	10	291 $\pm$ 8	308 $\pm$ 16	58 $\pm$ 2	58 $\pm$ 4	93 $\pm$ 2	118 $\pm$ 4**
	32	234 $\pm$ 15	308 $\pm$ 39*	65 $\pm$ 6	53 $\pm$ 2	94 $\pm$ 3	104 $\pm$ 3**
	100	193 $\pm$ 6	1073 $\pm$ 24***	54 $\pm$ 4	135 $\pm$ 5***	89 $\pm$ 1	111 $\pm$ 5**
III	10	126 $\pm$ 2	147 $\pm$ 19	38 $\pm$ 1	52 $\pm$ 2***	92 $\pm$ 1	112 $\pm$ 4**
	32	153 $\pm$ 3	294 $\pm$ 14***	39 $\pm$ 1	63 $\pm$ 1***	103 $\pm$ 1	110 $\pm$ 3**
	100	435 $\pm$ 18	1142 $\pm$ 69***	49 $\pm$ 1	120 $\pm$ 4***	96 $\pm$ 2	112 $\pm$ 3**

# Conclusões

- A biofortificação é uma estratégia viável para aumentar o teor nutricional de alimentos vegetais
- Confirmar biodisponibilidade
- Escolha do alimento
- Cuidados com sobre-acumulação
- A descodificação dos genomas abre os horizontes para outras aplicações

# Agradecimientos

- ✚ Dr. Michael Grusak
- ✚ Dr. Swapan Datta, IRRI-Philippines
- ✚ Dr. Thomas Clemente, Nebraska
- ✚ Bill and Melinda Gates Foundation
- ✚ CNRC lab
- ✚ ESB-UCP
- ✚ FCT



**Obrigada pela vossa  
atenção!**

