



11º Encontro Sabores & Saberes



Uso da tecnologia na produção de alimentos

Edna Oliveira

*Laboratório de Diagnóstico Molecular
Embrapa Agroindústria de Alimentos*

Uma breve história da Biotecnologia Moderna

1953

- **Descoberta da estrutura do DNA.**

anos 60

- **Compreensão da linguagem molecular dos genes.**

anos 70

- **Métodos para transferência de genes**

anos 80

- **Grandes avanços nas técnicas para análise e transferência dos genes;**

1983 - Kary Mullis inventou a Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)

- **Primeiros produtos na medicina (Insulina, 1983);**
- **Primeiros produtos para alimentos:
(Quimosina para produção de queijos, 1985).**

anos 90

- **Primeiras plantas GM comerciais.**

Quais cultivares foram desenvolvidos a partir destas plantas?





milho



cenoura



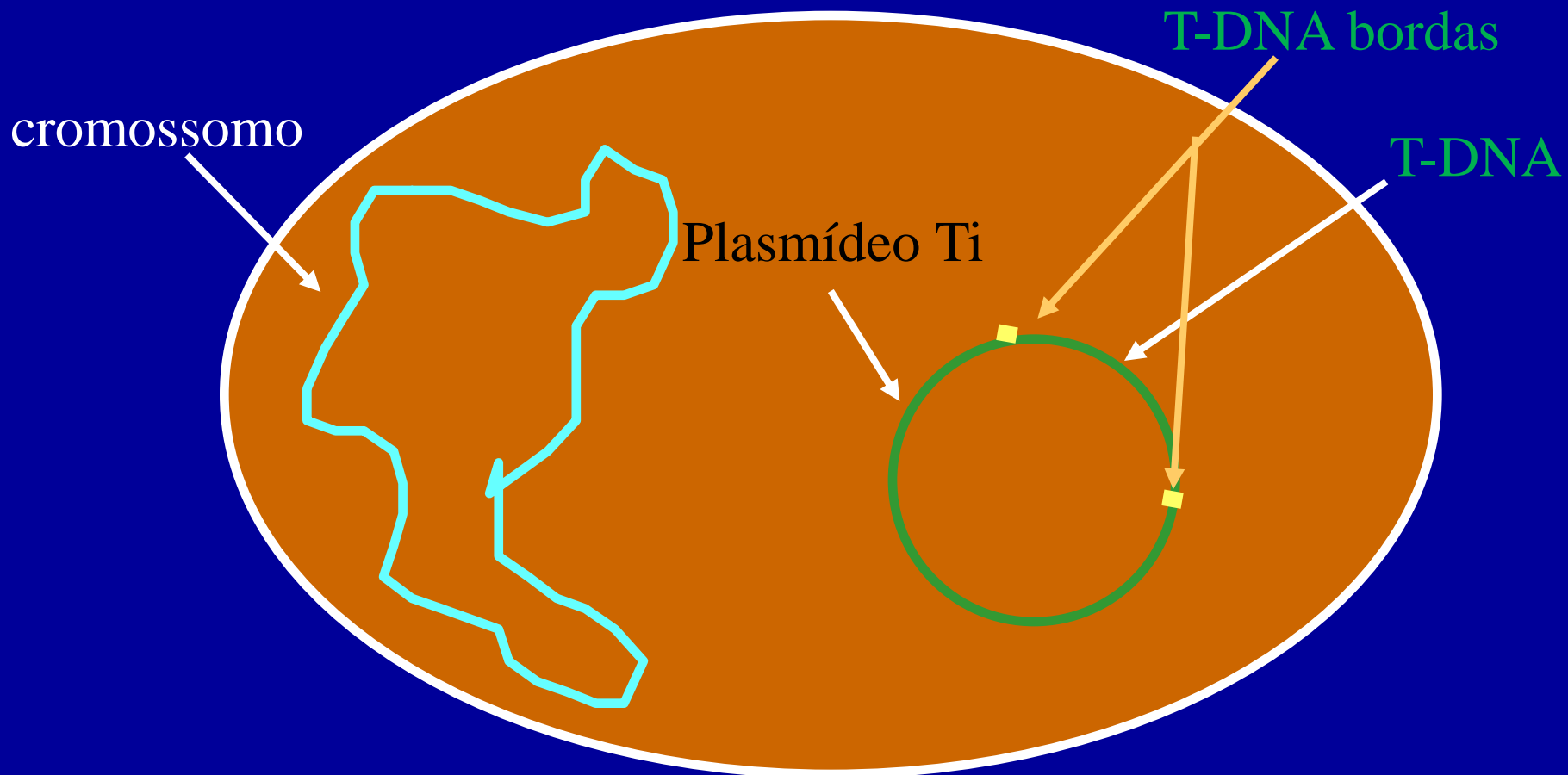
alface



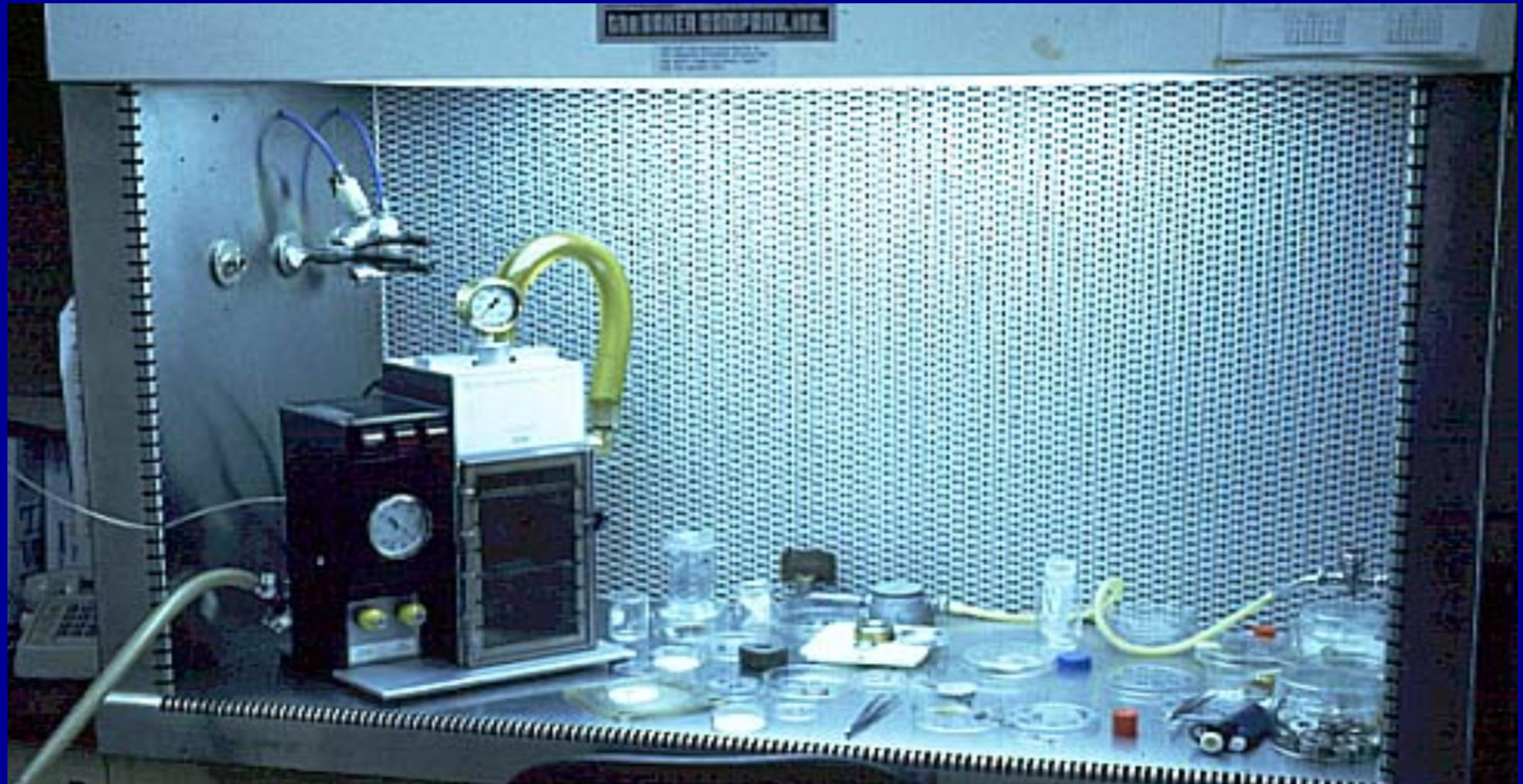
Engenharia Genética ou Moderna Biotecnologia



A natureza foi a primeira !



BIOBALISTICA

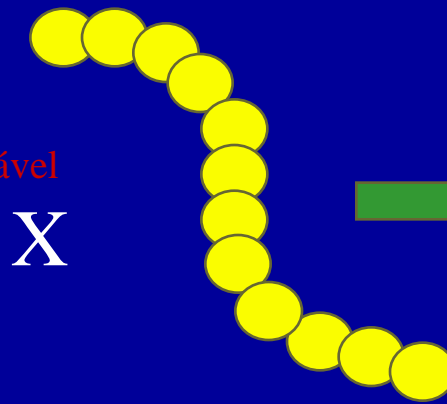
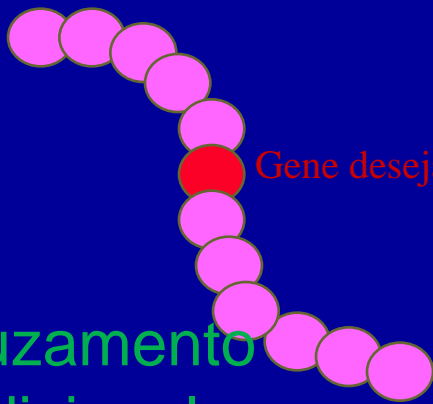


O Resultado são Modificações Mais Precisas...

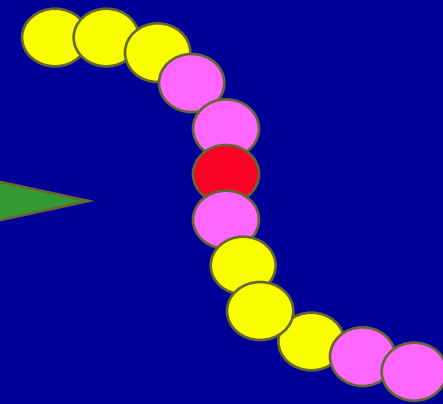
Variedade inicial

Variedade comercial

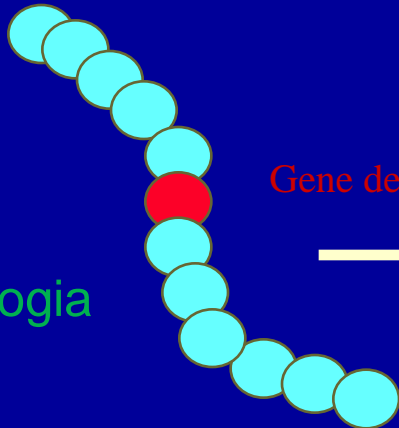
Resultado



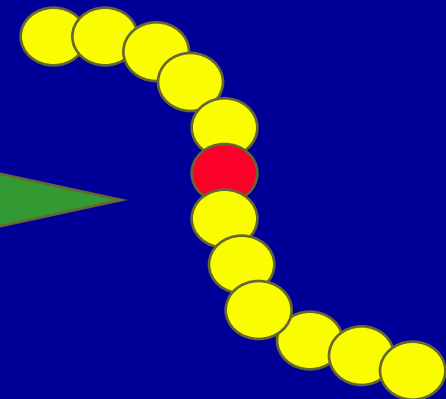
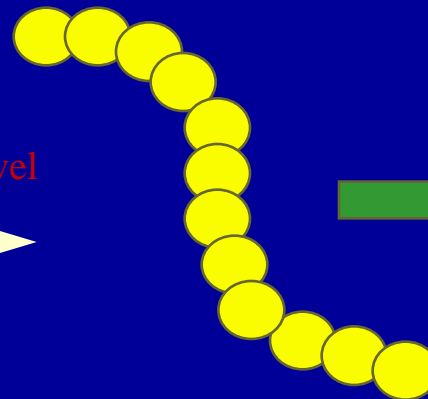
X



Cruzamento tradicional



Gene desejável

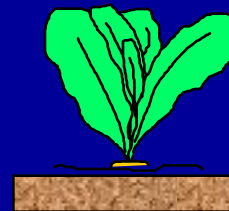
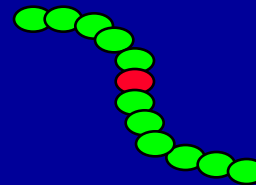


Biotechnologia moderna

O aperfeiçoamento genético pela biotecnologia

Como isso é feito?

- ◆ Identificar os genes para a característica desejada
- ◆ Cópias do gene
- ◆ Transferir para o tecido da planta
- ◆ Regenerar as plantas
- ◆ Análise e testes de segurança
- ◆ Testes de campo
- ◆ Aprovação
- ◆ Comercialização



10 anos

Avaliação de Segurança Alimentar de Alimentos Geneticamente Modificados

Estudo de caso

Segurança Alimentar - Definição

»»»» OECD (1993)

“Certeza razoável de que o uso intencional do alimento, nas condições previstas para consumo, não causará nenhum dano à saúde do consumidor.”

»»»» OMS (1996)

“Garantia de que o alimento não causará nenhum dano à saúde do consumidor quando preparado e/ou consumido de acordo com seu uso intencional.”

RISCO = PERIGO X Probabilidade

»»» PERIGO

Um agente biológico, químico ou físico, ou uma condição do alimento, com potencial para causar um efeito adverso à saúde.

»»» RISCO

Probabilidade do efeito adverso à saúde ocorrer, como consequência do perigo.

Assim, o risco depende do nível de exposição ao perigo e a existência do perigo, por si só, não implica em risco apreciável.

Valor de Cultivo e Uso (VCU)

- »»»» *Estudos necessários para o cadastramento de novas cultivares, nacionais e estrangeiras, no Registro Nacional de Cultivares (RNC), habilitando-as para produção e comercialização em todo território nacional.*
- Ensaio preliminar (valor agrônomo)
 - Ensaio principal (aptidão agrônoma)
 - Ensaio secundário (complementares)

**[http://www.cnpt.embrapa.br/
biblio/p_do12_6.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do12_6.htm)**

»»»» *Exemplo de VCU - Desempenho de linhagens de soja com adaptação regional específica (altitude elevada), realizado pela Embrapa Trigo:*

- 6 locais (SC e PR), 68 linhagens, 4 ensaios
- Ciclos de floração e maturação (dias)
- Estatura (cm)
- Acamamento (notas de 1 a 5)
- Nota visual dos grãos (1 a 5)
- Peso de 100 grãos (g)

Equivalência Substancial *(FAO/OMS, 2000)*

»»» *“O conceito de ES é empregado para identificar similaridades e diferenças entre o alimento GM e o análogo convencional com histórico de uso seguro, orientando, subsequentemente, o processo de avaliação de segurança.”*

Alimentos Geneticamente Modificados

»»» ANÁLISE COMPARATIVA

»»» “TÃO SEGURO QUANTO”

»»» “CASO A CASO”

Segurança Alimentar

- »»»» *Variabilidade natural*
- »»»» *Composição*
- »»»» *Efeito do processamento / cozimento*
- »»»» *Equivalência nutricional*
- »»»» *Medidas de Qualidade*
- »»»» *Proteína expressa*
- »»»» *Toxicidade*
- »»»» *Alergenicidade*

EXEMPLO: avaliação de segurança alimentar de soja tolerante ao herbicida glifosato (Soja RR)

- ▶▶▶▶ *Plantas, bactérias e fungos contêm EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)*
- ▶▶▶▶ *EPSPS participa na biosíntese de aa. aromáticos*
- ▶▶▶▶ *Ação da EPSPS é bloqueada pelo glifosato*
- ▶▶▶▶ *Plantas morrem se tratadas com glifosato*
- ▶▶▶▶ *Inserção do gene de Agrobacterium sp. que codifica síntese de EPSPS resistente ao glifosato*
- ▶▶▶▶ *Soja GM contêm 2 tipos de EPSPS*
- ▶▶▶▶ *Soja GM tolera o herbicida mas erva daninha não*

Variabilidade natural

»»»» *Diversos locais*

»»»» *Diversas gerações*

»»»» *Diferentes condições*

- *Sol*

- *Chuva*

- *Solo*

»»»» *Plantio e colheita sob as mesmas condições*

»»»» *Características morfológicas*

»»»» *Rendimento*

Estudos de Composição

»»»» *Macro e micronutrientes*

»»»» *Componentes chaves*

»»»» *Componentes antinutricionais/tóxicos*

Estudos de Composição

»»»» Composição centesimal

- Umidade*
- Proteína*
- Lipídeos*
- Carboidratos*
- Fibras*
- Cinzas*

»»»» Perfil de ácidos graxos

»»»» Perfil de aminoácidos

»»»» Isoflavonas (genisteína e daidzeína)

»»»» Antinutrientes

- Inibidor de tripsina,*
- Atividade de urease*
- Lectina,*
- Fitato*
- Rafinose, estaquiase*

Efeito do Processamento

»»»» *Produto é consumido cru*

»»»» *Produto é consumido cozido/processado
(sob quais formas?)*

Efeito do Processamento

»»» *Soja plantada em 6 regiões (1992) e 4 regiões (1993) dos Estados Unidos*

- *Grãos*
- *Farinha tostada (farelo)*
- *Farinha desengordurada não tostada*
- *Isolado protéico*
- *Concentrado protéico*
- *Óleo refinado*

Equivalência Nutricional

»»» Estudos realizados com animais

- ?
- ?
- ?
- ?

Equivalência Nutricional

»»» Estudos realizados com

- Peixes*
- Frangos*
- Gado de leite*
- Gado de corte*
- Porcos*
- Codornas*
- Ratos*

- Peso*
- Consumo de ração*
- Taxa de conversão ração / peso*
- Digestibilidade*
- Expectativa de vida*

Medidas de Qualidade

»»» *Esclarecimento para a indústria da carne*

- *Frangos*
 - *Composição da carne*
 - *Rendimento*
 - *Asas, coxas, sobre-coxas*
- *Gado leiteiro / leite*
 - *Produção de leite*
 - *Composição do leite*
- *“42-day broiler study”*
 - *Baixo custo, ocupam pouco espaço*
 - *Homogeneidade genética*
 - *Sensíveis a pequenas variações na ração*

Caracterização da Proteína Expressa

- »»»» *Produção e purificação*
- »»»» *Determinação da equivalência*
- »»»» *Identidade / composição*
- »»»» *Pureza / concentração*
- »»»» *Glicosilação*
- »»»» *Solubilidade*
- »»»» *Estabilidade ao armazenamento*
- »»»» *Atividade funcional*

Toxicidade

»»» Alimentos

- Misturas complexas
- Contribuição para a dieta não é apenas trivial
- Têm efeito na saciedade / balanceamento da dieta
- NOAEL ('no observed adverse effect level') = $\frac{\text{mg}}{\text{kg peso}}$
- Estudos toxicológicos = determinação da ADI
- ADI ('acceptable daily intake') = $\frac{\text{NOAEL}}{100}$

Toxicidade

»»»» *Letalidade aguda (LD_{50})*

»»»» *Toxicidade oral aguda ('acute mouse gavage')*

»»»» *"90-day rat feeding study"*

- *Toxicidade intravenosa?*
- *Carcinogenicidade?*
- *Sobre reprodução?*
- *Imunotoxicidade?*

Alergenicidade

»»»» Alergias alimentares – 2% da população

- Sintomas variam de leves (cutâneos, intestinais) a choque anafiláticos*
- 90% das alergias alimentares = amendoim, soja, leite, ovos, pescados, crustáceos, trigo e nozes*
- Novos alergênicos podem ser introduzidos na dieta pelo uso de produtos antes pouco consumidos*

Alergenicidade

»»»» *Análises de bioinformática*

- *Identidade da proteína expressa (seqüência de aminoácidos)*
- *Homologia estrutural (com bancos de dados de proteínas alergênicas / tóxicas)*

»»»» *Resistência à digestão pela pepsina*

- *Teste cutâneo por punctura?*
- *DBPCFC (provocação oral duplo-cego controlada com placebo)?*
- *Triagem com bancos de soro?*
- *Modelos animais?*

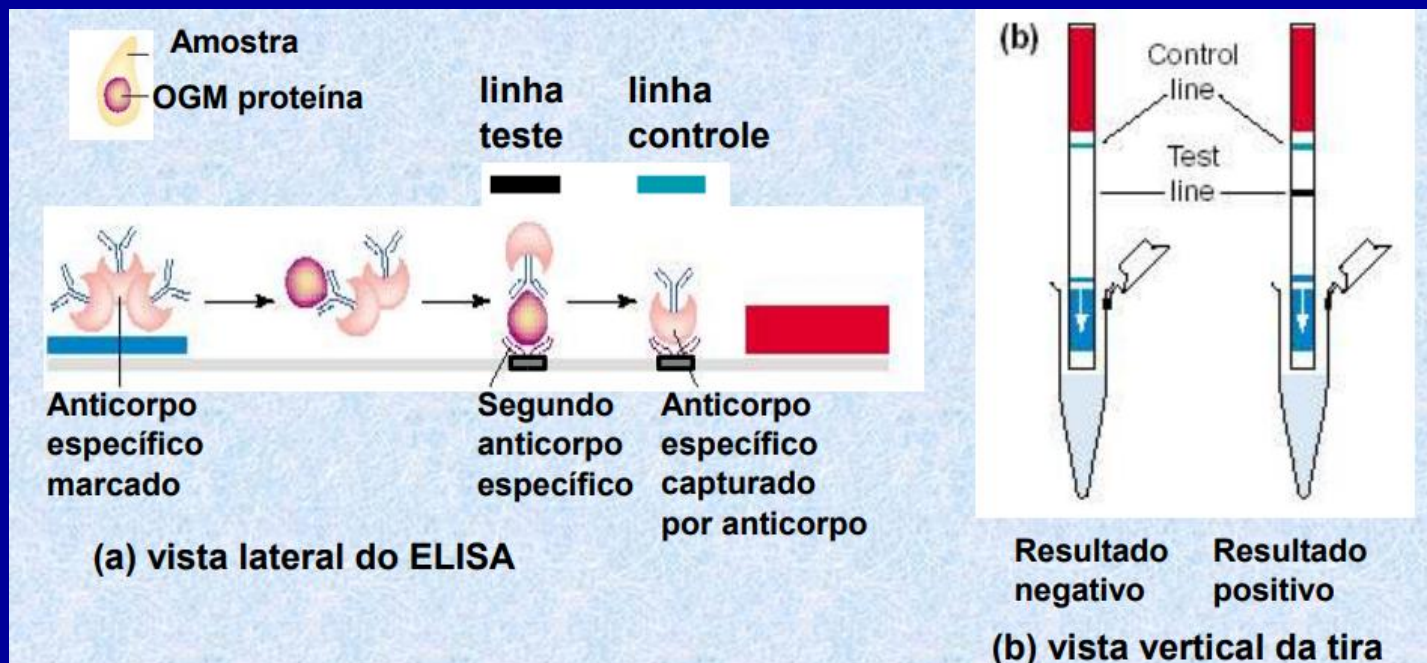
Parâmetros a serem estudados para a análise da segurança ambiental

- Testes agronômicos
- Transferência de DNA (pólen e sementes)
- Transferência horizontal de genes
- Efeito sobre organismos não-alvo (inimigos naturais, herbívoros não-alvo, polinizadores, organismos do solo, ervas daninhas...)
- Caracterização da planta (efeitos pleiotrópicos...)
- Desenvolvimento de Resistência

Monitoramento Pós-mercado

- Rastreabilidade
- Detecção no campo

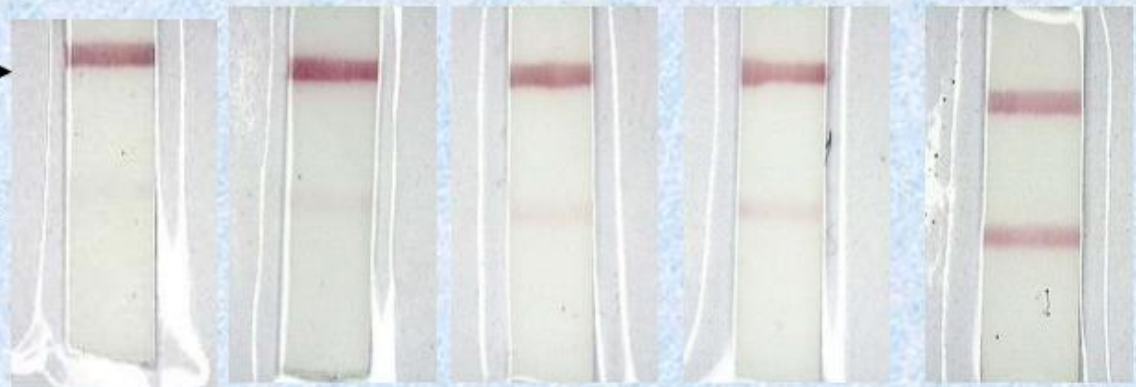
Testes imunocromatográficos (fita) - Proteínas



Ensaio Imunocromatográfico (Tiras)

Controle

Teste



Razão soja GM/soja
% Soja GM

1 /1000
0,1

2 /1000
0,2

5 /1000
0,5

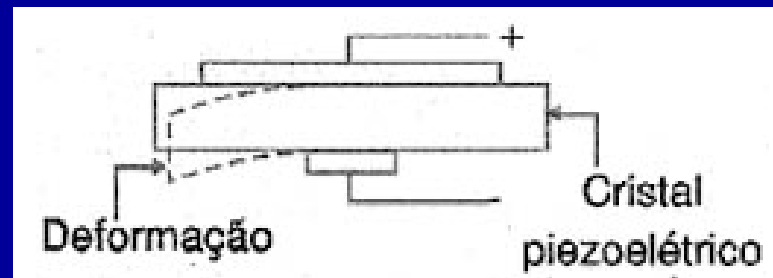
10 /1000
1

100 /1/900
10

- **Biossensores – DNA**
 - **Fluorescente**
 - **Piezoelétrico**

Propriedades **piezoelétricas** de certos cristais e do fenômeno da ressonância.

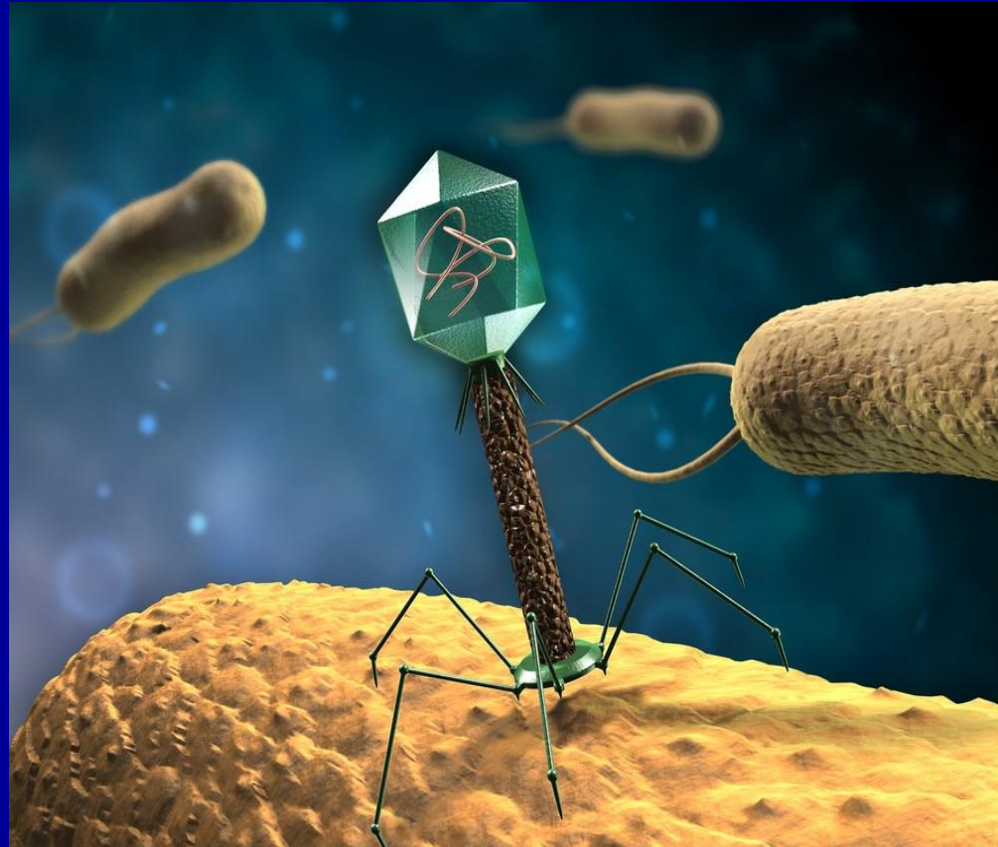
Determinados cristais (**quartzo, turmalina e o titanato**) quando deformados liberam cargas elétricas que se acumulam em suas faces. Essas cargas significam uma tensão elétrica que pode ser detectada por um circuito externo

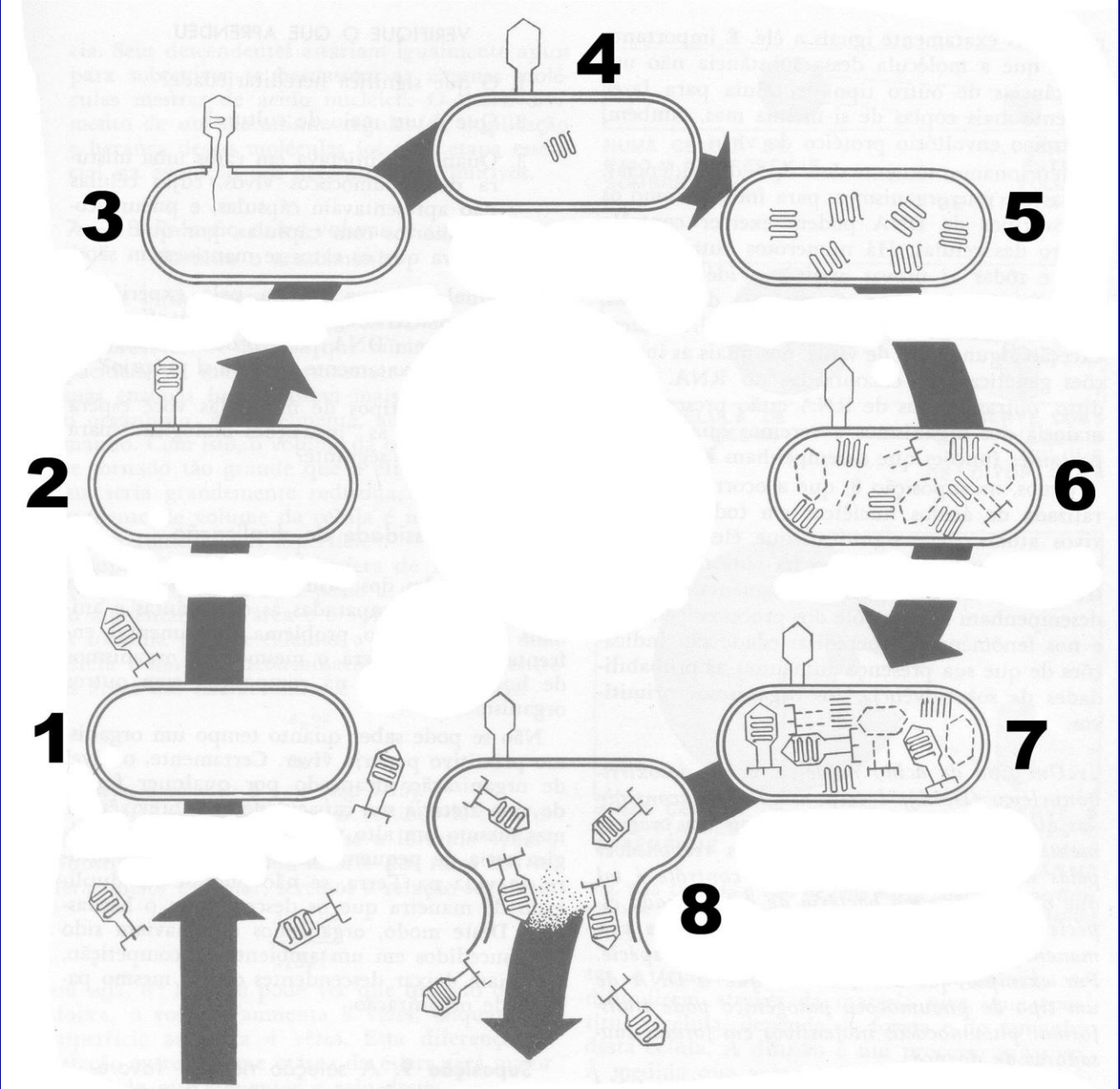


CRISPR

clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats

- ◆ Descoberta em 1987 pela Universidade do Japão (*E. coli*)
- ◆ Bactérias e Arqueas
- ◆ Baseado no sistema de defesa bacteriano

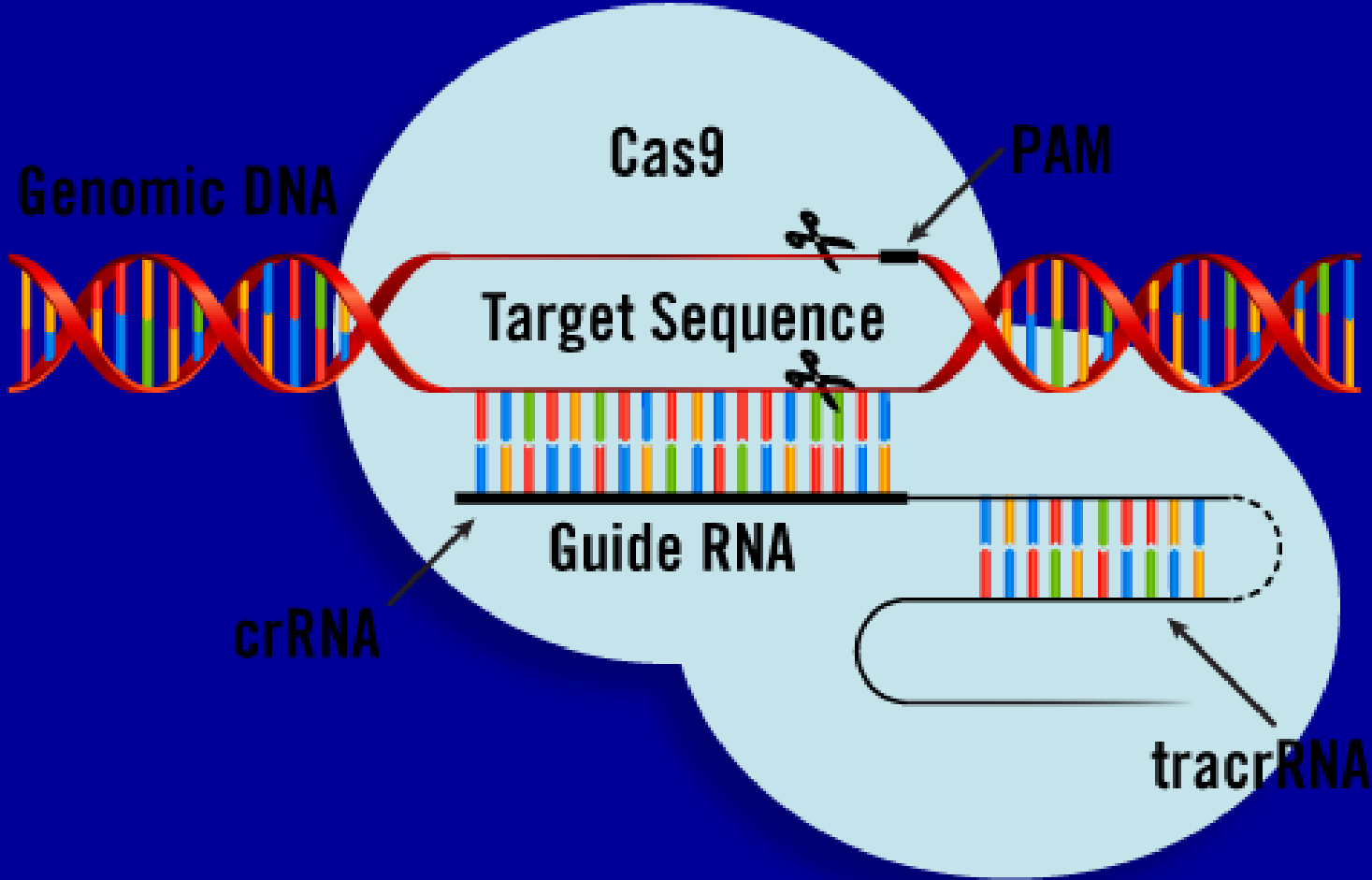




O que é um sistema CRISPR/Cas9?

- ◆ Sequências de DNA exógeno (do bacteriófagos) foram inseridas ao DNA cromossomal da bactéria
- ◆ Esta sequência possui regiões com repetições específicas (~30 pb), que permitem a identificação e destruição de DNAs invasores
- ◆ Sistema CRISPR/Cas9 é formado pela nuclease Cas9 e o RNA “guia”

CRISPR/Cas9



Vantagens da tecnologia CRISPR/Cas9

- ◆ Especificação através do RNA guia, que permite especificar onde ocorrerá a modificação
- ◆ Menor custo
- ◆ Alteração de múltiplos genes

Aplicações da tecnologia CRISPR/Cas9

- ◆ **Tratamento do câncer** (Volkan I. Sayin, Thales Papagiannakopoulos, 2017)
- ◆ **HIV** (Wang et al, 2017)
- ◆ **Biotecnologia em geral** (Samanta et al, 2016)

Grata pela atenção

edna.oliveira@embrapa.br