

A UTILIZAÇÃO DE ESTIRPES DE LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS EM ENOLOGIA

Dorit Schuller, Margarida Casal

Centro de Biologia, Universidade do Minho, 4710-057 Braga, Portugal
Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

Introdução

A inoculação de culturas puras de leveduras seleccionadas em mosto é, desde os anos 70, uma prática enológica corrente, permitindo produzir vinhos com as qualidades organolépticas desejadas e garantir a homogeneidade de colheitas sucessivas. Actualmente, a maioria da produção europeia de vinho apoia-se na utilização destas leveduras *starter*, previamente seleccionadas em função das suas boas capacidades fermentativas. Estudos biogeográficos realizados durante vários anos e a identificação da flora microbiana natural de determinadas regiões vitícolas constituíram o ponto de partida de programas mais consistentes de selecção e melhoramento de estirpes. No entanto, é improvável a existência natural de leveduras que possuam uma combinação ideal de características enológicas. Durante os anos seguintes à publicação da sequência do genoma de *Saccharomyces* (Goffeau *et al.* 1996), novas ferramentas genéticas tornaram a construção de estirpes de leveduras geneticamente modificadas um grande desafio. Actualmente, em todo o mundo, diversos laboratórios de investigação obtiveram já estirpes capazes de melhorar a eficácia fermentativa e a qualidade sensorial do vinho. As suas performances em condições enológicas foram também testadas de modo exaustivo. Uma introdução futura de leveduras OGM geneticamente modificadas requer também, em conformidade com a legislação actual, uma estimativa precisa do impacto sanitário e ambiental. As estirpes obtidas por auto-clonagem, técnica baseada na utilização de material genético proveniente de um hospedeiro, estão mesmo em vias de ser aprovadas. Entretanto, a atitude hostil dos consumidores face à utilização de leveduras geneticamente aprovadas na vinificação não sofreu alteração considerável nos últimos 10 anos, sendo esta a principal explicação para a ausência de estirpes recombinantes na indústria do vinho. Este trabalho faz uma análise global dos avanços recentes e das implicações da utilização de leveduras geneticamente modificadas em enologia. Neste artigo são também considerados vários aspectos, como por exemplo as estratégias utilizadas para a construção de estirpes conformes com as exigências da legislação em vigor, os métodos mais sensíveis e pertinentes para a detecção de ADN e proteínas recombinantes e os motivos que explicam a atitude crítica dos consumidores.

Seleção de estirpes enológicas comerciais

Descobertas recentes demonstraram que os resíduos existentes numa das ânforas de vinho mais antigas existentes no Egipto continham ADN ribossomal de *S. cerevisiae*, indicando que esta levedura era responsável pela fermentação alcoólica, pelo menos já em 3.150 ac (Cavaliere *et al.* 2003). A selecção realizada no decurso de milénios de vinificação pôde criar características enológicas interessantes que, no entanto, não foram disseminadas em larga escala, nem foram combinadas numa única estirpe. A selecção clonal de estirpes de *Saccharomyces* isoladas a partir do meio natural em zonas vitícolas de reconhecido interesse, é sempre o ponto de partida de qualquer programa de selecção de leveduras naturais. Leveduras *starter* seleccionadas são hoje largamente utilizadas dadas as suas muito boas propriedades fermentativas e também o seu importante contributo para a standardização do

processo de fermentação e da qualidade do vinho. Actualmente, são comercializadas cerca de 150 estirpes de leveduras enológicas diferentes, principalmente *S. cerevisiae*. Se for considerada a tendência actual para uma produção de vinhos de elevada qualidade com propriedades particulares, a procura de «leveduras especiais para perfis originais» por parte dos vinificadores está ainda por satisfazer (Mannazzu et al. 2002; Pretorius 2000; Romano et al. 2003b).

A escolha da estratégia de selecção apropriada depende sempre das características que a estirpe enológica deve possuir e do número de estirpes que deverão ser analisadas. Os numerosos compostos sintetizados variam acentuadamente em função da estirpe de *S. cerevisiae* considerada. Como recapitulado na Tabela 1, múltiplas características enológicas foram sujeitas a avaliação. O controlo do desenvolvimento da fermentação e a determinação de perfis quantitativos por análise química no fim da fermentação permitem a obtenção de dados tecnologicamente pertinentes.

Características enológicas	Comentário
Vigor da fermentação	Quantidade máxima de etanol (% v/v) produzido em fim de fermentação Desejável: boa produção de etanol
Taxa de fermentação	Gramas de CO ₂ produzido no decurso das primeiras 48 horas da fermentação Desejável: início rápido da fermentação
Modo de multiplicação em meio líquido	Crescimento disperso ou floculante, velocidade de sedimentação Desejável: Multiplicação de leveduras dispersa durante a fermentação, ocorrendo a sedimentação no seu final
Produção de espuma	Altura de espuma produzida durante a fermentação Não desejável: produção excessiva de espuma
Ótimo de temperatura de fermentação	Termotolerância e criotolerância estão relacionadas com as propriedades enológicas. A temperatura óptima de fermentação situa-se entre 18 e 28°C
Acidez volátil, produção de ácido acético	As estirpes seleccionadas não devem libertar mais de 100 a 400 mg/l durante a fermentação. Não desejável: produção em excesso
Degradação ou produção de ácido málico	O aspecto desejável ou não da produção ou degradação dependem das características do mosto. A degradação de ácido málico varia entre 0 e 20% em função da estirpe de <i>S. cerevisiae</i>
Produção de glicerol	Sub-produto favorável e maior da fermentação (5-8 g/l) contribuem para o aumento da doçura, corpo e volume do vinho
Produção de acetaldeído	Metabolitos favoráveis no caso do Xerez, vinho de sobremesa e porto; critério importante de selecção para as estirpes destinadas ao estágio do vinho
Ésteres, alcoóis superiores e compostos voláteis	Metabolitos favoráveis que influenciam fortemente o aroma do vinho, estando dependentes da presença de precursores ligados quer à casta quer à maturação da

	uva. Quantidades limitadas contribuem positivamente para as características sensoriais globais
Tolerância ao SO ₂ e produção	Agente antioxidante e antimicrobiano. Desejável: capacidade e vigor fermentativos elevados em presença de teores em SO ₂ usuais em enologia. Não Desejável: produção excessiva de SO ₂
Produção de H ₂ S	Determinada por coloração de colónias formadas em meio indicador à base de bismuto, isto é BIGGY Agar. O H ₂ S é prejudicial à qualidade do vinho; é um dos defeitos com um nível de detecção muito baixo (50 a 80 µg/l)
Resistência ao stress	Tolerância aos stresses ácidos e osmóticos combinados
Resistência ao cobre	Fortes concentrações em cobre podem originar paragens de fermentação. Desejável: Forte resistência ao cobre e capacidade de reduzir o teor em cobre

Tabela 1: Critérios enológicos considerados na selecção de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

Encontrar estirpes de leveduras possuindo uma combinação ideal de características enológicas continua a ser algo altamente improvável, e a selecção é por isso orientada para as leveduras não-*Saccharomyces* como *Candida*, *Kloeckera*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes* ou *Rhodotorula*. As espécies não-*Saccharomyces* carecem de competitividade em condições enológicas uma vez que não são suficientemente vigorosas para a realização da fermentação e apresentam uma resistência ao stress mais reduzida que a *S. cerevisiae*. No entanto, as culturas *starter* mistas ou a fermentação sequencial (isto é, *Candida cantarellii* / *S. cerevisiae*) para orientar as fermentações no sentido de uma produção acrescida de glicerol e menor produção de ácido acético, foram utilizadas com sucesso (Toro *et Vazquez* 2002). As leveduras *Torulaspora delbrueckii* e *Candida stellata* contribuem de forma positiva para a qualidade aromática global do vinho, enquanto que as leveduras apiculadas como *Kloeckera apiculata* têm uma influência negativa devido à associação entre reduzida produção de álcool e formação de importantes quantidades de ácido acético e acetato de etilo (Ciani *et Maccarelli*, 1998)

Inúmeras referências apontam influências positivas e negativas das leveduras não-*Saccharomyces* sobre a composição volátil dos mostos de diferentes castas (Ciani *et Maccarelli* 1998; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004; Granchi *et al.*, 2002; Mingorance-Cazorla *et al.*, 2003; Plata *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2003c) tendo sido também encontradas diferenças consideráveis relativamente a estes compostos entre as estirpes comerciais e as autóctones de *S. cerevisiae* (Patel *et Shibamoto*, 2003; Romano *et al.*, 2003a; Steger *et Lambrechts* 2000).

As estirpes não-*Saccharomyces* produzem e segregam diversas enzimas, tais como pectinases (aumentam o volume de extracção de mosto, melhoram a clarificação e facilitam a filtração do vinho), β-glicosidasas (hidrolisam os precursores aromáticos glicosídicos não voláteis existentes na uva), esterases (contribuem para a formação de compostos aromáticos) ou as lipases (degradam os lípidos da uva ou intervêm sobre as reacções de autólise das leveduras) (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 2000; Fleet

et Heard 1993; Otero et al., 2003). A *S. cerevisiae* não é uma levedura que produza quantidades significativas de enzimas para ter um impacto efectivo sobre a produção de vinho. A sua principal contribuição é uma secreção de β -glicosidase (Restuccia et al. 2002; Rodriguez et al. 2004). As leveduras não-*Saccharomyces* são comercializadas para a desacidificação do mosto para consumo de ácido málico, como é o caso das células imobilizadas de *Schizosaccharomyces pombe* (comercializadas pela PROENOL) (Silva et al., 2003).

Engenharia genética de estirpes enológicas de *S. cerevisiae*

Dada a grande exigência das práticas enológicas modernas, constata-se um interesse continuamente crescente relativamente às estirpes especializadas de *S. cerevisiae* que possuem um vasto leque de propriedades novas ou optimizadas. Ao melhoramento genético das estirpes industriais por recurso à genética clássica (isto é, mutagenese ou fusão protoplástica) seguiu-se a utilização de tecnologias de recombinação de ADN nos últimos 20 anos. A publicação do genoma completo de *S. cerevisiae* (Goffeau et al. 1996) e um arsenal crescente de tecnologias, permitiram avanços significativos nos domínios da genética molecular, da fisiologia e da biotecnologia. A construção de estirpes comerciais especializadas tornou-se possível, principalmente pela expressão de genes heterólogos ou por modificação do equilíbrio de genes (superexpressão ou supressão). Os principais objectivos para o melhoramento de estirpes são: a melhoria do processo de produção e da qualidade, como por exemplo a melhoria das performances fermentativas, uma maior tolerância ao etanol, uma melhor utilização do açúcar e assimilação de azoto, e qualidades organolépticas acrescidas conseguidas por uma modificação do perfil sensorial. Estes pontos são desenvolvidos por diversos autores (Blondin et Dequin, 1998; Dequin, 2001; Dequin et al., 2003; Pretorius, 2000; Pretorius et Bauer, 2002; Pretorius et al., 2003) como é apresentado na Tabela 2 (ver fim do artigo).

Em geral, todo o material genético utilizado para a construção de micro-organismos destinados à fermentação alimentar deve resultar de espécies hospedeiras (auto-clonagem) ou de organismos GRAS (Generally Regarded As Safe – organismos geralmente considerados inofensivos) com uma história de utilização inócua no que se refere à indústria agro-alimentar, enquanto que deve ser evitada a utilização de sequências de ADN resultantes de espécies taxonomicamente próximas de espécies patogénicas. A expressão de genes heterólogos foi utilizada na maioria dos casos, quer genes de interesse, isolados por exemplo de *Lactobacillus casei* (*LDH*), *Lactobacillus plantarum* (*pdC*), *Bacillus subtilis* (*padC*), *Pediococcus acidilactici* (*pedA*), *Schizosaccharomyces pombe* (*mae1* e *mae2*), de choupo híbrido (*4CL216*), de videira (*vst1*), de *Aspergillus sp.* (*egl1*, *abfB*, *xlnA*, *rhaA*) ou de *Fusarium solani* (*peIA*), ou ainda de outros como *ATF1*, *GPD1* ou *PGU1* resultantes de *S. cerevisiae* (Tabela 2).

Muitas vezes são utilizados promotores e finalizadores fortes, derivados de enzimas glicolíticas e que são expressos em condições de fermentação (*ADH1*, *ADH2*, *PGK*) mas também do gene actine (*ACT*). As leveduras industriais não têm, habitualmente, marcadores autotróficos (*LEU2*, *URA2*), sendo por isso utilizado o gene de leveduras *CYH2*, o qual apresenta resistência às ciclohexamidas ou marcadores heterólogos de resistência às toxinas como *ble* (Tn5) ou *G418* (Tn903), os quais conferem resistência à fleomicina e à geneticina, respectivamente. Não é recomendado o desenvolvimento de estirpes industriais com vectores *shuttle* multi-cópia, transportando marcadores de resistência à ampicilina de *Escherichia coli* e às toxinas de leveduras, uma vez que a possibilidade de transferência de ADN à microflora intestinal é considerada como improvável mas não inexistente. Contudo, no caso das leveduras enológicas, a este processo é atribuída uma importância reduzida, uma vez que as células são

eliminadas após a fermentação. Os genes plasmídicos deveriam ser preferencialmente integrados, uma vez que os elementos inseridos devem ser estáveis no novo organismo construído. Tais aproximações ocorreram, no entanto, em determinados casos (Lilly *et al.*, 2000; Malherbe *et al.*, 2003; Volschenk *et al.*, 2001). Quando ocorre uma ruptura genética numa etapa com marcadores autotróficos, como foi efectuado para o gene *GPD* (Michnick *et al.*, 1997), resulta uma estirpe auto-clonada, como foi definido previamente (ILSI, 1999), o que é uma aproximação consideravelmente menos problemática no que se refere à avaliação da aceitabilidade. A secreção de proteínas extracelulares, por exemplo a pediocina codificada pelo gene *pedA* ou a glucose oxidase codificada pelo gene *gox*, estava habitualmente sujeita a um sinal de secreção da feromona factor α de conjugação (*MFa1s*) (Malherbe *et al.*, 2003; Schoeman *et al.*, 1999).

As modificações introduzidas não devem modificar as características essenciais da actividade do hospedeiro no processo de fermentação. Para a maior parte das modificações genéticas, foi possível demonstrar que para além das alterações metabólicas introduzidas não foi revelada nenhuma diferença significativa entre os vinhos produzidos com uma estirpe comercial e os vinhos produzidos com a correspondente estirpe modificada, em termos de características enológicas. Inversamente, a produção acrescida de glicerol devida à expressão modulada de *GPD* conduziu a uma redução do rendimento em etanol (1% v/v) e a uma acumulação de produtos secundários tais como o piruvato, o acetato, a acetoína, e o 2,3-butanodiol (Michnick *et al.*, 1997). A eliminação de *ALD6* originou uma produção reduzida de ácido acético (-40 a -70%) ao nível do perfil de glicerol, do succinato e do butanodiol (Remize *et al.*, 2000). Foi ainda demonstrado que a acidificação do mosto devida à expressão acrescida de *LDH* e à produção consequente de ácido L(+) láctico depende dos antecedentes genéticos de *S. cerevisiae* e igualmente da casta utilizada para a produção do mosto (Dequin *et al.*, 1999). Os vinhos contendo 1,8 a 2,0% de álcool, ou menos, foram obtidos pela utilização de estirpes que superexpressam a glucose-oxidase, uma vez que esta enzima produz L-glucono- δ -acetona e ácido glucónico a partir da glucose (Malherbe *et al.*, 2003).

Recentemente, uma estirpe de leveduras utilizada na produção de *saké* foi aprovada pelo governo japonês como levedura auto-clonada, deixando por isso de ser considerada como OGM (Akada, 2002). Foi utilizada a substituição genética em duas etapas para a construção de uma estirpe desprovida de sequências marcadoras bacterianas e de resistência às toxinas. Uma mutação pontual (Gly1250Ser) no gene codificante da sintetase de ácidos gordos de leveduras *FAS2* confere uma resistência à cerulenina e está associada a uma mais forte produção caproato de etilo, um composto do *saké* japonês com aroma de maçã. Foi utilizado um novo marcador de contra-selecção, sendo este um promotor de superexpressão de galactose-indutível e a sequência inibidora de crescimento *GIN11* (*GALp-GIN11*). As células que retêm o marcador não crescem em meios com galactose dada a inibição causada pela superexpressão de *GIN11*. Um plasmídeo contendo o gene *FAS2* mutado, um marcador de resistência às toxinas e o marcador contraseleccionável foram integrados no locus de tipo indígena *FAS2*, e a perda de sequências plasmídicas resultantes dos integrantes foi conduzida pelo crescimento em meio contendo galactose, o qual é permissivo à perda de *GALp-GIN11*. As estirpes contra-seleccionadas continham quer a versão indígena, quer a versão mutante do alelo *FAS2*, mas não as sequências de plasmídeos, sendo a diferença existente entre o mutante descrito e a estirpe indígena correspondente uma única base (Akada *et al.*, 1999; Aritomi *et al.*, 2004). O tipo de contra-selecção evocada pode assim ser utilizada para introduções múltiplas de genes cromossómicos, uma vez que aquela é necessária para trabalhar sobre vias metabólicas. Outras estratégias, como por exemplo a mutagenese dirigida do gene *MET10* da sulfito-redutase, permitiram desenvolver leveduras produtoras de menor quantidade de

sulfureto de hidrogénio (H₂S) (Sutherland *et al.*, 2003). O alelo *LEU4-1* confere resistência ao 5,5,5-trifluoro-DL-leucina e as estirpes correspondentes produzem o dobro da quantidade de álcool isoamílico em fermentação à escala laboratorial, relativamente às estirpes-mãe (Bendoni *et al.*, 1999).

O genoma de *S. cerevisiae* foi o primeiro genoma eucariótico a ser sequenciado e será provavelmente o primeiro organismo a ver revelado os seus transcriptómero, proteómero e metabolómero. Dado o facto de numerosos aspectos fisiológicos estarem sujeitos a uma regulação multigene complexa, a compreensão do processo de expressão dos genes no decurso da fermentação do vinho contribuirá para o conhecimento da composição genética das estirpes de leveduras comerciais e influenciará o melhoramento das estirpes enológicas através da engenharia genética. Estas abordagens são também as mais adaptadas para demonstrar que as alterações introduzidas não originam efeitos colaterais inesperados ou adversos, como por exemplo a produção de substâncias tóxicas.

No futuro, estirpes específicas poderão servir de reserva genética natural em programas de melhoramento de leveduras, desde que a ligação entre os fenótipos observados e a análise da expressão global revele informações úteis para a construção de estirpes de leveduras auto-clonadas. Os genes poderão vir a ser dissociados dos seus reguladores e induzidos apenas por condições específicas de fermentação. Tais estirpes poderão, por exemplo, possuir uma actividade β-glicosidase (Rodriguez *et al.*, 2004) ou ser capazes de reduzir o cobre do mosto por acumulação intracelular (Brandolini *et al.*, 2002), ou ainda ser privadas da sua actividade sulfito-redutase (Mendes-Ferreira *et al.*, 2002; Spiropoulos *et al.*, 2000), ou produzir reduzidas quantidades de ácido acético (Romano *et al.*, 2003a).

Regulamentação relativa a organismos geneticamente modificados com utilização alimentar

Em Maio de 1997 entrou em vigor o Regulamento europeu EC258/97 sobre os novos alimentos e ingredientes alimentares (EC 1997), nele sendo indicados os alimentos e ingredientes contendo ou consistindo em organismos geneticamente modificados (OGM) ou produzidos por organismos geneticamente modificados, podendo, no último caso, estar presentes ou não no alimento. A segurança alimentar de um alimento derivado de um OGM deve ser avaliada por comparação com o alimento mais próximo cujo consumo, historicamente, é tido por seguro. Isto significa que se um alimento derivado de um OGM for semelhante em substância ao alimento convencional, o novo alimento é “tão seguro” como o alimento convencional correspondente, devendo ser tratado como tal, devendo as diferenças detectadas vir a ser objecto de investigações toxicológicas, analíticas e nutricionais mais aprofundadas. Para esta avaliação é necessário o conhecimento detalhado de diversos factores: características do conjunto e do património genético dos organismos, origem desse(s) gene(s) transferido(s) e da função do(s) gene(s) modificado(s). Considerando que o resultado final de uma modificação genética depende dos processos controlados por numerosos genes diferentes e que as suas funções são ainda pouco conhecidas, métodos rigorosos de identificação e de caracterização dos efeitos indesejáveis à escala genómica, proteómica e metabólica estão actualmente em fase de testagem para a sua utilização de rotina (Corpillo *et al.* 2004; Kuiper *et al.* 2003; Kuiper *et al.* 2002).

Na nova regulamentação sobre alimentação foram recentemente introduzidas emendas, pela adopção de três decretos relativos a organismos geneticamente modificados e a alimentos que deles derivam, utilizados em nutrição humana e animal: EC1829/2003 (EC 2003a), 1830/2003 (EC 2003b) e 65/2004 (EC 2004), os quais definem os procedimentos para a autorização, etiquetagem e traçabilidade. O regulamento 1829/2003 detalha as informações a fornecer para uma solicitação de autorização de comercialização de um produto. O requerente deve provar que o alimento em questão (1) não tem efeitos indesejáveis sobre a saúde humana e animal, nem sobre o ambiente, (2) não induz em erro o consumidor e (3) não difere do alimento que visa substituir, de tal modo que o seu consumo normal não seja nutricionalmente desvantajoso para o consumidor. Tais produtos devem ser sujeitos a avaliação sanitária antes de serem colocados no mercado, juntamente com um dossier técnico onde constem informações detalhadas sobre resultados obtidos em ensaios de investigação e desenvolvimento a fim de avaliar o impacto do OGM sobre a saúde e o ambiente. O Anexo III da Directiva 2001/18/EC (EC 2001) sobre a utilização deliberada de OGM para colocação no mercado ou qualquer outro objectivo revoga assim a anterior Directiva 90/220/EC (EC 1990) do Conselho. Como a colocação de um produto no mercado implica a sua libertação no meio ambiente, deve ser realizada uma avaliação do seu impacto ambiental, de acordo com o Anexo II da Directiva 2001/18/EC (EC 2002). O produto é posteriormente sujeito a um procedimento de aprovação promovido conjuntamente pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), localizada em Bruxelas, a Comissão Europeia e os seus Estados-membros. A etiquetagem é obrigatória, mesmo quando o ADN recombinante da proteína correspondente não é detectável no produto final. Os alimentos contendo OGM devem ser etiquetados com «geneticamente modificado(a)» ou «produzido a partir de (nome do ingrediente) geneticamente modificado(a)». A etiquetagem não é obrigatória para os alimentos contendo traço de OGM, fortuitos e tecnicamente inevitáveis, numa proporção inferior a 0,9% dos ingredientes alimentares (relação entre ingrediente recombinante e não recombinante). Enquanto que a regulamentação alimentar se apoiava no princípio da prova, no sentido em que a etiquetagem é obrigatória para os produtos alimentares contendo mais de 1% de OGM, o regulamento EC1829/2003 apoia-se no princípio da aplicação, impondo uma declaração de utilização de OGM no decurso da produção do alimento; no entanto, esta declaração não se baseia na detecção de ADN ou de proteína recombinante no produto final. Segundo os regulamentos Em função dos regulamentos N° 1830/2003 (EC 2003b) e 65/2004 (EC 2004), os OGM e os produtos derivados de OGM devem possuir traçabilidade em cada etapa do seu processo de colocação no mercado, ao longo de toda a cadeia de produção e de distribuição, a fim de facilitar a recolha dos produtos se necessário e para facilitar a aplicação de medidas de gestão de riscos.

A regulamentação americana não impõe a etiquetagem nem a discriminação dos produtos geneticamente modificados. Nenhuma etiquetagem específica é exigida para os alimentos de “bioengenharia” (termo utilizado pela Food and Drug Administration norte-americana para os alimentos derivados de tecnologias de modificação genética), uma vez que «não são considerados como significativamente ou uniformemente diferentes de outros alimentos, nem como uma ameaça à segurança alimentar diferente ou superior daquela colocada por alimentos resultantes de processos tradicionais de melhoramento genético de plantas cultivadas». (Registo Federal 57 FR 22984 de 29 de Maio). A avaliação e a aprovação antes da colocação no mercado é exigida unicamente quando os genes introduzidos codificam um produto que nunca houvesse sido um composto de qualquer outro alimento, tal como um novo agente edulcorante, por exemplo. As exigências de etiquetagem que se aplicam aos alimentos devem «explicitar todos os elementos materiais» de um alimento, por exemplo se um alimento geneticamente modificado difere do seu homólogo tradicional, possui propriedades nutricionais significativamente diferentes, ou se está presente um alergénico potencial.

Os vinhos produzidos por leveduras OGM deveriam ser considerados, em geral, como substancialmente equivalentes aos vinhos “tradicionais”. Compostos como o glicerol, o acetato de etilo, o ácido málico ou o ácido láctico são substâncias naturais do vinho e os seus teores seriam simplesmente ajustados ou otimizados de modo a melhorar estas qualidades organolépticas. A concentração visada é muito susceptível de pertencer ao leque de concentrações encontradas em determinados estilos de vinho. Por outro lado, um processo tecnológico facilitado e mais económico, como a utilização de leveduras que exprimam enzimas pectolíticas, não terá qualquer impacto sobre a composição ou as propriedades do produto final, uma vez que a adição de enzimas comerciais é uma prática enológica habitual. Qualquer que seja a situação, é indispensável a realização de um estudo minucioso e caso a caso.

Avaliação dos riscos ambientais associados à utilização de leveduras geneticamente modificadas

A utilização de leveduras geneticamente modificadas dependerá da capacidade para avaliar os riscos potenciais ou teóricos ligados à sua introdução nos ecossistemas naturais.

O acompanhamento da disseminação de estirpes industriais de leveduras nas vinhas envolventes de adegas que tenham utilizado essas estirpes durante os 5 a 10 anos precedentes, serviu de modelo experimental para estimar o destino das leveduras geneticamente modificadas no ambiente natural. Estes estudos de grande escala desenvolvidos ao longo de períodos de 3 anos, em vinhas situadas no norte de Portugal e no sul de França revelaram que a disseminação de leveduras comerciais na vinha é limitada a distâncias e períodos de tempo curtos, e é largamente favorecida pela presença de água de escorrência. Entre as amostras colhidas a mais de 100m da adega, menos de 2% da microflora fermentativa tinha um perfil genético idêntico ao das leveduras comerciais. Nas amostras colhidas muito próximo da adega e das águas de escorrência, a proporção de leveduras comerciais aumentou 10 a 43%. A grande maioria (94%) das leveduras comerciais foi detetada a uma distância da adega entre 10 e 200m. As estirpes comerciais, apesar da sua utilização anual intensiva, não parecem desenvolver-se claramente nas vinhas e não predominam sobre a flora indígena, sendo a sua presença caracterizada por flutuações naturais de aparecimento/desaparecimento periódico como as estirpes autóctones (Valero et al, 2005).

O comportamento das leveduras OGM entre as populações microbianas de uma adega e de uma estufa com vinha em ambiente confinado foi também avaliado. A partir de uma estirpe comercial X, diferentes estirpes modificadas foram construídas, possuindo genes heterólogos codificadores de α -amilase (*LKA1*), endo- β -1,4-glucanase (*end1*), xilanase (*XYN4*) ou pectato liase (*peh1*) sob o controlo de promotores e de terminadores fortes e utilizando marcadores de resistência *kanMX* ou *SMR-410*. Após a caracterização inicial da flora de leveduras autóctone de uma vinha recentemente instalada numa estufa confinada, as vinhas de 4 blocos (cada um constituído por 20 pés) foram aspergidas com suspensões de leveduras contendo $2,5 \times 10^6$ CFU/mL, de acordo com metodologia previamente definida. Apesar da concentração celular ser inicialmente elevada, foi isolado um reduzido número de estirpes *S. cerevisiae* nos controlos quinzenais da população de leveduras presente nas uvas, folhas, tronco e solo. Os resultados demonstraram (1) não existir nenhuma diferença significativa na relação entre a ocorrência de estirpes modificadas e a de estirpes comerciais “parentais”, mesmo para as estirpes OGM com uma suposta vantagem selectiva sobre as estirpes parentais, o que demonstra que as modificações mencionadas não conferem nenhuma vantagem de implantação ambiental; (2) que o conjunto das populações de leveduras presentes nos blocos aspergidos era muito idêntico ao das vinhas testemunhas não tratadas, conduzindo à conclusão que nem as estirpes comerciais nem as estirpes OGM afectam o equilíbrio ecológico da flora da vinha num sistema

confinado; (3) que no decurso de micro-vinificações espontâneas e no que se refere às capacidades fermentativas das estirpes, não foi constatada nenhuma diferença significativa entre elas (Bauer *et al.*, 2003).

A transferência horizontal de ADN pode acontecer entre espécies de leveduras pertencentes a complexos de espécies *sensu stricto*, originando híbridos viáveis a partir dos dois grupos cromossómicos parentais (Marinoni *et al.*, 1999). A transformação natural das leveduras de panificação com o ADN de plasmídeos foi observada em condições naturais de carência nutritiva, quando as células em paragem de crescimento metabolizam os açúcares sem adição de nutrientes. Isto foi apresentado como um mecanismo de evolução que contribui para a diversificação genética, sendo este cenário possível em meio natural. Actualmente alguns estudos em curso pretendem estimar a semelhanças de transferência de genes, quer horizontais, quer verticais, entre leveduras comerciais enológicas modificadas, em condições de produção de vinho (Bauer *et al.*, 2003).

Um outro parâmetro, igualmente importante para estimar a segurança da utilização das leveduras OGM em enologia, é a medição da libertação potencial e da estabilidade de ADN recombinante e da(s) proteína(s) correspondente(s) durante a fermentação e estágio em contacto com as borras. A autólise das células de levedura caracteriza-se por uma perda de permeabilidade membranar, uma hidrólise de macromoléculas celulares como o ADN e as proteínas, seguida de uma libertação dos produtos desta hidrólise para o meio extracelular. Este processo ocorre imediatamente após as células terem concluído o seu ciclo de vida, Foram realizadas experiências sobre autólise utilizando meios de cultura de laboratório, tendo sido demonstrado que uma incubação a 40°C durante 10 a 14 dias a valores de pH entre 4 e 7 conduz a uma degradação de 55% do ADN total, associada à libertação de, particularmente, desoxirribonucléotidos e de, em menor escala, polinucleótidos no meio extracelular (Zhao *et al.*, 2003).

Métodos de detecção de ADN ou de proteínas geneticamente modificadas

Até à data, não existe qualquer dado concreto quanto à presença e concentração de células, de ADN e de proteínas recombinantes nos vinhos «experimentais» produzidos a partir de leveduras geneticamente modificadas. Estima-se que o número de células recombinantes por garrafa é bastante reduzido (1 a 10 células), uma vez que estas são eliminadas por filtração ou tratamento térmico. A traçabilidade do ADN recombinante no decurso da cadeia de produção e no vinho acabado requer técnicas extremamente sensíveis. Considerando os recentes Regulamentos europeu n.º 1829/2003 e 1830/2003, torna-se claro que são necessários métodos analíticos fiáveis e precisos para todos os alimentos contendo OGM ou produzidos por recurso a OGM. Ao longo de anos anteriores, com este objectivo, foram desenvolvidos e aplicados métodos de análise quer de proteínas, quer de ADN, particularmente para a detecção de soja e de milho transgénicos e seus derivados.

Para a detecção de proteínas e tendo por objectivo, principalmente, a sua utilização em detecção imunoquímica, e nos processos de análise Western blot e ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), foram desenvolvidos anticorpos monoclonais e policlonais. Os testes imunocromatográficos, Reveal CP4 e Reveal Cry9C, também designados testes sobre tiras de fluxo lateral, detectam 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfatase sintetase (EPSPS), derivada da estirpe CP4 de *Agrobacterium sp.*, que confere resistência ao glifosato utilizado em herbicidas aplicados em culturas de milho e soja, e proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* que asseguram a protecção das plantas aos insectos, em sementes e grãos de milho. Os dois kits comercializados pela Neogen, de custo reduzido e com uma boa sensibilidade, detectam a presença de OGM em 5 a 20 minutos (fracção mássica de OGM <0,125%); Os dois são testes

operacionais e fiáveis para controlar a distribuição de produtos derivados da biotecnologia (Ahmed, 2002; Auer, 2003; Brett *et al.*, 1999; Rogan *et al.*, 1999; Stave, 1999; van Duijn *et al.*, 1999, 2002).

Os métodos baseados em PCR (*Protein Chain Reaction* - Reacção de Polimerização em Cadeia) são também aplicados na detecção de OGM por amplificação de elementos genéticos presentes na maioria dos OGM actualmente disponíveis na Europa. O limite da detecção situa-se entre 20 pg e 10 ng de ADN alvo, o que corresponde a 0,0001 a 1% da fracção mássica de OGM (Ahmed 2002; Auer 2003; ILSI 1998, 2001; Meyer 1999; van Duijn *et al.* 1999, 2002). A técnica de QC-PCR (*Quantitative-competitive* PCR) baseia-se na amplificação paralela do gene transgénico e de um gene endógeno de referência que controla quer a ausência de inibição, quer de amplificabilidade de ADN alvo da amostra. A quantificação é possível por comparação das concentrações dos produtos PCR com as proporções variáveis da relação ADN alvo/ADN *standard*. Esta abordagem foi testada com sucesso aquando da realização de um trabalho de colaboração entre 12 laboratórios europeus de controlo, o qual permitiu a detecção de 0,1% de ADN OGM (Hübner *et al.*, 1999; Lüthy, 1999). As tecnologias de PCR em tempo real são extremamente sensíveis e convêm a uma quantificação precisa de ADN presente em reduzidas concentrações, uma vez que medem a produção de cadeias amplificadas de ADN no decurso da fase log-linear da amplificação PCR (Ronning *et al.*, 2003; Vaitilingom *et al.*, 1999). A quantificação de produtos de PCR por teste ELISA (ELISA-PCR) foi recentemente descrita como uma alternativa muito sensível e económica à PCR em tempo real (Liu *et al.*, 2004; Petit *et al.*, 2003).

Embora as matérias-primas alimentares possam ser facilmente identificadas como OGM, a detecção de OGM torna-se mais difícil quando os produtos são resultado de algum processo de transformação: alimentos com um processamento complexo contêm ADN degradado e substâncias que interferem mesmo com a reacção PCR. A avaliação inter-laboratórios dos procedimentos foi essencial e possibilitou o desenvolvimento de normas internacionais (DIN, ISO, EN) relativas à amostragem (DIN 2003), à extracção de ADN (DIN 2002b), à detecção de OGM com base no ADN (DIN 2002a) e com base em proteínas (DIN 2002c).

A avaliação tecnológica dos OGM, as modificações das regulamentações governamentais e a adopção de directivas de avaliação dos riscos irão continuar a orientar o desenvolvimento de técnicas de análise que serão aplicadas futuramente a organismos geneticamente modificados. Novos métodos de identificação baseados em transcriptómica, proteómica e metabolómica foram propostos como as abordagens não dirigidas mais adequadas para a detecção de efeitos secundários (Kuiper *et al.* 2003), tendo a análise proteómica demonstrado uma «equivalência substancial» entre um tomate OGM resistente a um vírus e os híbridos não transgénicos (Corpillo *et al.*, 2004).

Percepção e comportamentos do consumidor

Em 1988, Gist-Brocades obteve uma estirpe de panificação cujos genes codificadores da permease à lactose e à maltase foram substituídos por um conjunto de genes mais eficazes resultantes de uma outra estirpe. Uma vez que nenhum ADN não-*Saccharomyces* estava presente, as autoridades britânicas acordaram o seu consentimento em 1989. Alguns anos mais tarde, uma estirpe recombinante para panificação, obtida em 1993 por Brewing Research International, foi igualmente aprovada. Esta estirpe de *S. cerevisiae* continha um gene de amilase resultante de *Saccharomyces diastaticus* associado com um gene de resistência ao cobre. Dada a relutância da indústria em provocar uma reacção negativa dos consumidores, nenhuma destas estirpes foi produzida com objectivos comerciais (Moseley 1999). Pelas mesmas razões, nos últimos anos não foi registada qualquer procura de estirpes

enológicas geneticamente modificadas, embora tenham sido desenvolvidas um número elevado de estirpes (Tabela 2) em consequência da procura crescente de diversidade e inovação no seio da indústria de bebidas fermentadas.

Um dos mais vastos inquéritos à opinião pública (quanto ao número de pessoas interrogadas) realizado na Europa foi o Eurobarómetro que seguiu as alterações de atitude relativamente à biotecnologia em diferentes Estados-membros europeus, desde o início dos anos 90. O último inquérito, realizado em 2001 (Anonymous, 2001), junto de 16.000 cidadãos europeus, demonstrou existir uma visão positiva generalizada da ciência e da tecnologia; no entanto, os avanços científicos não são considerados a panaceia universal para todos os problemas. A quase totalidade (95%) dos inquiridos indicaram a reduzida margem de escolha possibilitada aos consumidores, relativamente aos alimentos geneticamente modificados, é o principal motivo da sua atitude negativa e 60% apontaram o facto de os OGM serem potencialmente prejudiciais ao meio ambiente. Considerando que numerosos conceitos científicos são pouco conhecidos do público, a percepção do risco para o consumidor e o seu comportamento diferem significativamente dos defendidos pelos peritos em risco científico que tornam complexas as discussões sobre tecnologias transgênicas, aumentando do mesmo modo a desconfiança do público e a carga negativa em torno das biotecnologias em geral e os OGM em particular. As crenças dos que criticam as tecnologias de modificação genética incluem a degradação da qualidade nutricional dos alimentos, a toxicidade potencial, a possível resistência aos antibióticos, a alergenicidade e a cancerosidade potencial resultante do consumo de OGM, a poluição ambiental, a transferência de genes indesejáveis, a criação eventual de novos vírus e toxinas, considerações religiosas, culturais e étnicas, do mesmo modo que o medo do desconhecido (Uzogara, 2000).

Como indicado na Figura 1, os receios dos consumidores relativamente às modificações genéticas estão associados a numerosos parâmetros, isto é, alterações menores nos alimentos estão associadas a um fraco nível de receio, e assim a atenção manifestada relativamente a esses produtos e às suas vantagens foi reduzidamente notada. No que respeita à aplicação de biotecnologias à alimentação, os benefícios foram apercebidos como marginais, abstratos e apenas interessando ao produtor. Esta perspectiva foi confirmada especialmente para a cerveja geneticamente modificada, à qual se seguiu o tomate, o morango e o salmão. Para o vinho, enquanto bebida tradicional de eleição, pode ser estimado que a sua produção por tecnologia genética obteria uma opinião dos consumidores comparável à expressa para o caso da cerveja. Todas as modificações implicando os seres humanos ou os animais foram associadas a níveis elevados de preocupação ética, enquanto que as aplicações medicinais, tal como a farmacologia e o tratamento de doenças hereditárias, foram apontadas como as mais importantes e necessárias (Frewer 2003; Frewer et al. 1997).

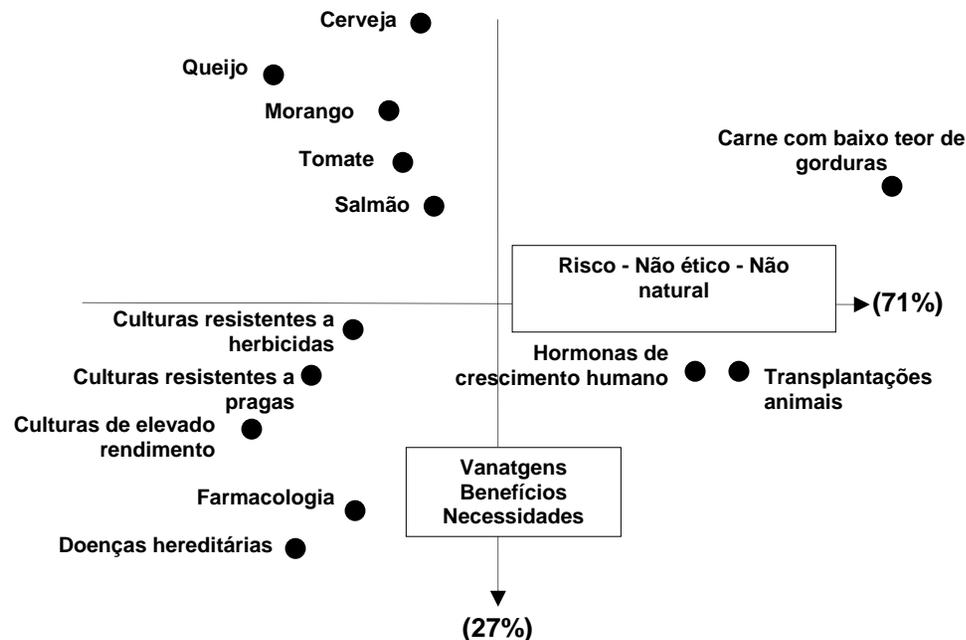


Figura 1: percepções públicas do risco ou do benefício dos alimentos geneticamente modificados (adaptado de Frewer, 2003)

Em conclusão, a recente disponibilidade de regulamentação legal e clara, que define as exigências para a construção e avaliação da segurança dos OGM, do mesmo modo que a etiquetagem dos produtos seus derivados, pode ser considerada como uma etapa crucial para ajudar o consumidor a fazer escolhas claras; um futuro próximo dirá se esta estratégia é uma etapa útil a percorrer no sentido de uma atitude menos negativa por parte do consumidor. A construção de estirpes de leveduras enológicas geneticamente modificadas deve ser alcançada através de estratégias de auto-clonagem. Neste contexto, estirpes específicas resultantes do ambiente vitivinícola de espaços enológicos favoráveis podem ser utilizadas, no futuro, como reservatório genético natural para a construção de tais estirpes, conferindo assim uma nova dimensão à exploração da diversidade de estirpes de levedura.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelos projectos ENOSAFE (n.º 762, Programa AGRO, medida 8), pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e pelo LeVini (POCTI/AGR/56102/2004), Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal.

Tabela de referências disponíveis quando solicitadas (por@infowine.com)

Objectivo de melhoramento	Metabolismo / proteína (s)	Gene (s)	Origem	Construção					Referência	
				P	T	Pla	M	Chr		
Qualidade sensorial	Endoglucanase	<i>egl1</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>ACT</i>	-	2μ	<i>CYH2</i>	-	(Pérez-González et al. 1993)	
	Enzimas libertadoras de aromas	Arabinofuranosidase	<i>Aspergillus niger</i>	<i>ACT</i>	-	2μ	<i>CYH2</i>	-	(Sanchez-Torres et al. 1996)	
Complexidade e intensidade do aroma global	Endoxilânase	<i>xlnA</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>ACT</i>	-	2μ	<i>CYH2</i>	-	(Ganga et al. 1999)	
	Ramnosidase	<i>rhaA</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>GPD</i>	<i>PGK</i>		<i>TRP</i>	-	(Manzanares et al. 2003)	
	Ajustamento da acidez	Malato permease	<i>mae1</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2μ	<i>SMR1-140</i>	+	(Volschenk et al. 2001)
	Enzima málica	<i>mae2</i>								
	Enzima maloláctica	<i>mleS</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2μ	<i>URA3</i>		(Volschenk et al. 1997)	
	Enzima maloláctica									
	Acetaldeído desidrogenase	<i>ALD6</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				<i>kanMX4</i>		(Remize et al., 2000)	
		(supressão)								

	Lactato desidrogenase	<i>LDH</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2μ	<i>G418</i> (<i>Tn903</i>)	-	(Dequin <i>et al.</i> , 1999)
Produção de glicerol	Glicerol-3-fosfato desidrogenase	<i>GPD1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2μ	<i>ble</i> (<i>Tn5</i>)	-	(Michnick <i>et al.</i> , 1997, Remize <i>et al.</i> , 1999)
Formação de fenóis voláteis	Ácido fenólico descarboxilase	<i>pdc</i> <i>padc</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2μ	<i>URA3</i>		(Smit <i>et al.</i> , 2003)
Produção de acetato de éster	Álcool acetiltransferase	<i>ATF1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2μ	<i>LEU2</i>	+	(Lilly <i>et al.</i> , 2000)
Produção de H ₂ S	Sulfito redutase	<i>MET10</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						(Sutherland <i>et al.</i> , 2003)
Aspectos de sanidade e salubridade	Produção de resveratol	β-glucosidase	<i>Candida molischiana</i>	<i>ACT</i>	<i>ACT</i>	2μ	<i>CYH2</i>	-	(Gonzalez-Candelas <i>et al.</i> , 2000)
	Resveratol sintetase	<i>4CL216</i>	<i>Hybrid poplar</i>	<i>ADH2</i>	<i>ADH2</i>	2μ	<i>URA3</i>	-	(Becker <i>et al.</i> , 2003)
	Coenzima-A ligase	<i>vst1</i>	<i>Grapevine</i>	<i>ENO2</i>	<i>ENO2</i>	2μ	<i>LEU2</i>	-	

		Bloqueio da	CAR1							
	Eliminação de etil carbamato	secreção de ureia	(supressão)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						(Pretorius <i>et al.</i> , 2003)
Controlo de microorganismos cantaminantes	Produção de enzimas antimicrobianas	Pediocina	pedA	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2 μ	URA3	-	(Schoeman <i>et al.</i> , 1999)
		Quitinase	CTS1-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2 μ		-	(Carstens <i>et al.</i> , 2003)
		Leucocina	IcaB	<i>Leuconostoc carnosum</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2 μ	URA3	-	(du Toit and Pretorius, 2000)
		Glucose oxidase	gox	<i>Aspergillus niger</i>	<i>PGH1</i>	<i>PGK1</i>		URA3	+	(Malherbe <i>et al.</i> , 2003)
Capacidade fermentativa	Tolerância ao stress	Trealose	TPS1,TPS2, ATH1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						(Pretorius <i>et al.</i> , 2003)
		Glicogénio	GSY1, GSY2							
Conversão completa		Esteróis	SUT1, SUT2							

de açúcar em álcool e CO2 sem o desenvolvimento de aromas indesejáveis	Incorporação e assimilação de açúcar	Transportadores de hexoses	HXT1-18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Pretorius <i>et al.</i> , 2003)
		Hexosoquinases	HXK1, HXK2		
	Assimilação de azoto	Prolina oxidase	PUT1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Pretorius <i>et al.</i> , 2003)
		Pirrolina-5-carboxilato desidrogenase	PUT2		
		Repressores PUT 1 e PUT 2	ure2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Salmon <i>et Barre</i> 1998)
Tolerância ao etanol	Acumulação de esteróis		SUT1, SUT2,	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Pretorius <i>et al.</i> , 2003)
	Actividade ATPase membranar		PMA1, PMA2		
Resistência agro-	Metalotioneina		CUP1	<i>Saccharomyces</i>	(Pretorius <i>et al.</i> ,

	química	formadora de quelatos de cobre		<i>cerevisiae</i>						2003)
Eficiência de processamento	Eliminação de polissacáridos colmatantes	Endopoligalacturonase	PGU1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PGK1</i>	<i>LEU2</i>	-			(Vilanova <i>et al.</i> , 2000)
Colagem e clarificação		Pectato liase	pelA	<i>Fusarium solani</i>	<i>ACT</i>	-	<i>CYH</i>	2μ	-	(Gonzalez-Candelas <i>et al.</i> , 1995)
	Duração de floculação	Floculina	FLO1, FLO11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>HSP30</i>					(Pretorius <i>et al.</i> , 2003)

Tabela 2: Objectivos para o melhoramento de *S cerevisiae* (adaptado de Pretorius, 2000, e Pretorius et al., 2003), com indicação, se possível de exemplos de estratégias empregues para as modificações genéticas.