



VARIEDADES TRANSGÊNICAS E MEIO AMBIENTE

Segurança ambiental das variedades comerciais

Aluizio Borém

Eng. Agrônomo, M.S., Ph.D. e Professor da Universidade Federal de Viçosa
borem@ufv.br

As variedades geneticamente modificadas foram, pela primeira vez, comercialmente plantadas em 1994, com o lançamento do tomate *Flavr Savr*, nos Estados Unidos. Desde então, estas variedades vêm sendo cultivadas em áreas crescentes em diversos países, tanto nas Américas quanto na Europa, África e Oceania. A área cultivada com variedades transgênicas atingiu, em 2003, 67,8 milhões de hectares, envolvendo mais de 17 países e dezenas de espécies importantes na produção de víveres. Todos os grandes produtores e exportadores mundiais de alimentos já utilizam essa tecnologia.

A seguir são apresentadas, a título de ilustração, considerações sobre a segurança ambiental de algumas variedades geneticamente modificadas e que são plantadas em vários países. As considerações sobre a segurança alimentar de algumas delas são discutidas no livro *Biotechnology e Nutrição* (Costa e Borém, 2003). O leitor poderá encontrar na literatura especializada, bem como em *sites* das agências reguladoras dos organismos geneticamente modificados, dados específicos referentes às demais análises de biossegurança realizadas com essas variedades.

Soja tolerante a herbicida – Evento GTS 40-3-2

A soja (*Glycine max*) é cultivada em mais de 80 países, gerando mais de 162 milhões de toneladas métricas de grãos. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador dessa leguminosa. A soja é utilizada como constituinte em muitos alimentos pro-

cessados e representa a principal fonte de óleo e de proteína para uso em rações destinadas à alimentação animal.

Plantas daninhas constituem um dos principais fatores limitantes na produção agrícola desta cultura. Tipicamente, elas são controladas com uma combinação de práticas culturais (aração e gradagem) e métodos químicos. Dependendo das espécies daninhas prevaletentes, herbicidas, como trifluralina, metribuzim e outros, são aplicados. A soja RR, obtida via transformação gênica, evento GTS 40-3-2, foi desenvolvida pela Monsanto para ser tolerante ao herbicida glifosato, visando permitir seu uso no controle das plantas daninhas. Essas variedades de soja possuem uma forma modificada da enzima EPSPS (5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase) que permite à planta sobreviver à aplicação do herbicida glifosato. O gene inserido nessas variedades foi extraído da bactéria natural do solo *Agrobacterium tumefaciens* estirpe CP4.

Resumo dos elementos genéticos introduzidos

Gene: *cp4 epsps* (5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase) de *Agrobacterium* sp. cepa CP4.

Peptídeo de trânsito: ctp

Promotor: E35S.

Finalizador: *nos 3'*

Características da soja

Centro de origem: Sudeste da Ásia; espécies de soja silvestre são endêmicas na China, na Coreia, no Japão, em Taiwan; raramente exibe

qualquer característica de dormência de sementes, não é forte competidor com outras espécies silvestres ou cultivadas.

Modo de reprodução: autofecundação.

Características do organismo doador

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria nativa do solo que vem sendo largamente utilizada em transformação gênica nos últimos 17 anos. É considerada segura para o homem e animais, não havendo nenhuma evidência ou relato de qualquer efeito adverso por ela causado.

Considerações sobre segurança ambiental

Testes em campo

A soja RR, evento GTS 40-3-2, foi testada nos Estados Unidos, no Canadá, em Porto Rico, no México, na Argentina, na Costa Rica, e em outros países a partir do início da década de 90. No Brasil, esses estudos iniciaram-se a partir de 1997. Estudos agrônômicos de rendimento de grãos, adaptabilidade, estabilidade de comportamento, incluindo outras características agrônômicas, foram conduzidos em diferentes ambientes e anos de plantio. Os dados coletados indicam que esta soja é tão segura para o plantio em escala comercial quanto as demais variedades convencionais e que ela não oferece nenhum risco para o meio ambiente ou para os sistemas agrícolas de se tornar uma planta invasora.

Taxa de fecundação cruzada

A introgressão do gene de tolerância ao glifosato da soja RR é extremamente improvável de acontecer, uma vez que no Brasil e demais países da América nenhum parente da soja cultivada é encontrado, além de esta espécie ser autógama, isto é, de autofecundação, com taxa de fecundação cruzada em geral menor que 1% (Borém, 2000; Sedyiyama et al., 1999).

A soja cultivada (*Glycine max*) cruza naturalmente com a espécie silvestre *G. soja*. Porém, esta só ocorre naturalmente na China, na Coreia, no

Japão, em Taiwan e na Rússia e não é encontrada no meio ambiente no Brasil. Dessa forma, a probabilidade de transferência da característica tolerância ao glifosato da soja RR para seus parentes ou para outras espécies, por fluxo gênico, é muito pequena.

Invasibilidade

O gene *cp4 epsps* do evento GTS 40-3-2 não conferiu nenhuma vantagem competitiva ou maior habilidade de sobrevivência à soja na natureza, características típicas de espécies invasoras e colonizadoras. A tolerância ao glifosato só confere vantagem competitiva às plantas submetidas a pulverizações com esse herbicida. Adicionalmente, a soja cultivada não exibe nenhuma característica típica de espécies daninhas, como dormência de sementes, desuniformidade de maturação, sistema de dispersão de sementes, hábito de crescimento trepador, dentre outras. Conclui-se, então, que a soja RR não possui potencial para invadir e, ou, colonizar ecossistemas agrícolas ou silvestres, portanto é considerada segura para o plantio comercial.

Efeitos adversos secundários

Dados de campo da soja RR, evento GTS 40-3-2, mostraram ausência de efeitos adversos em organismos-não-alvo, sugerindo que a proteína CP4 EPSPS modificada presente nos tecidos da planta transgênica não foi tóxica aos organismos benéficos encontrados na natureza. A proteína CP4 EPSPS não resultou em toxicidade alterada ou alergenicidade, como demonstrado em estudos com dose oral aguda e crônica com ratos e outros animais em laboratório (Costa e Borém, 2003). Adicionalmente, o fato de que proteínas homólogas a EPSPS são onipresentes na natureza e comuns em plantas, fungos e alguns outros micróbios indica sua segurança para organismos-não-alvo. A alta especificidade dessa enzima para seu substrato torna improvável que a enzima introduzida metabolize outros substratos endógenos para produzir compostos secundários tóxicos aos organismos benéficos. Todos os dados experimentais indicam que a soja ge-

neticamente modificada, evento GTS 40-3-2, não possui nenhum efeito adverso sobre organismos benéficos ou em organismos-não-alvo.

Efeito sobre a biodiversidade

A soja RR não possui nenhuma característica fenotípica nova que promoveria a extensão de seu plantio além das regiões geográficas onde atualmente se cultiva esta leguminosa. Como não há nenhum parente silvestre da soja no Brasil e esta não é uma espécie invasiva e colonizadora, a característica tolerância ao glifosato seguramente não será transferida a outras espécies, modificando a biodiversidade nativa presente no Brasil.

Milho resistente a lagartas – Evento MON810

O milho é cultivado comercialmente em mais de 100 países. Os três maiores produtores mundiais são Estados Unidos, China e Brasil. O milho é matéria-prima para a produção de amido, cuja maioria é transformada em adoçantes e produtos fermentados. Óleo de milho é extraído do germe dos grãos, sendo apenas pequena parte dos grãos inteiros utilizada diretamente na alimentação humana. Entretanto, derivados dessa espécie estão na mesa do brasileiro diariamente na forma de cereais (sucrilhos), pães, bolos e produtos indiretos, como laticínios, ovos etc.

As lagartas, da ordem dos Lepidópteros, são as mais sérias pragas da cultura do milho. O uso de inseticidas químicos tem sido o método mais comum de controle dessas pragas nas últimas décadas. Dois importantes aspectos do controle químico das lagartas têm estimulado os cientistas a buscar formas alternativas de controle: poluição ambiental decorrente dos inseticidas e seu elevado custo.

O evento MON810 foi desenvolvido pela Monsanto, com a introdução do gene *cry1Ab* proveniente da bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* (Bt). Esse gene codifica para a produção da proteína Cry1Ab, uma deltaendotoxina. MON810 produz essa proteína em uma dose efetiva durante

o ciclo da cultura, controlando algumas lagartas-praga do milho.

A deltaendotoxina Cry1Ab vem sendo amplamente usada na agricultura, inclusive por produtores orgânicos, como formulações comerciais. O uso de Bt para controle biológico das pragas é um procedimento bem conhecido e aceito por mais de 30 anos. Adicionalmente, *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria com disseminação natural no ambiente e em alimentos e completamente inócua aos mamíferos, inclusive ao homem.

Desde 1997, o evento MON810 é adotado com sucesso nos Estados Unidos, com a denominação YieldGard, sem que qualquer efeito adverso tenha sido observado, enquanto a produtividade aumenta por volta de 10%. Seu uso foi aprovado nos Estados Unidos, na Europa, no Japão, no Canadá e em alguns outros países. Todas as aprovações sucederam a extensivos testes de biossegurança.

Resumo dos elementos genéticos introduzidos

Gene: *cry1Ab*, que codifica para a produção da proteína delta endotoxina Cry1Ab, de *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki*.

Promotor: E35S.

Características do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea monóica, isto é, tem órgãos masculino (pendão) e feminino (espiga) separados, porém na mesma planta. A inflorescência masculina (pendão) localiza-se na parte terminal do colmo, enquanto as femininas (espigas), nas axilas foliares. A quantidade de pólen produzida é muito acima da necessidade da planta. Há estimativas de que, para cada óvulo que se desenvolve em um grão, a planta produza de 9.000 a 50.000 grãos de pólen (Weatherwax, 1955). Depreende-se então que, se considerada a espiga com média de 500 grãos, tem-se cerca de 4,5 a 25 milhões de grãos de pólen por planta (Eastham e Sweet, 2002).

Modo de reprodução: Tipicamente fecundação cruzada, com taxa de alogamia em torno de 95%, sendo a dispersão do pólen feita pelo vento. A viabilidade do pólen é de cerca de

30 minutos após sua liberação em condições ambientais. O milho é sexualmente compatível com o teosinto e raramente com outras espécies do gênero *Tripsacum*.

Características de organismo do doador

Embora pragas-alvo, tipicamente lagartas, sejam suscetíveis a doses orais da proteína Bt, não há evidências de efeitos tóxicos a mamíferos ou pássaros à dose de até 10µg proteína/g de peso corporal. A proteína Bt tem sido considerada um dos bioinseticidas mais seguros, tanto que é facultado aos agricultores orgânicos o seu uso no controle de pragas.

Considerações sobre segurança ambiental

Testes em campo

Avaliações em campo de produtividade, adaptabilidade, estabilidade de comportamento, resistência ao acamamento e outras características agronômicas foram feitas em diferentes ambientes e anos de plantio com o milho Bt, evento MON810. Todos os dados indicam que variedades contendo este evento são tão seguras para o plantio comercial como as convencionais e que elas não oferecem riscos para o meio ambiente ou para os sistemas agrícolas.

Foi constatado nos experimentos conduzidos que o evento MON810 não alterou a produção, viabilidade e demais características do pólen. Foi também observado que a dispersão do pólen pelo vento e a taxa de fecundação cruzada não foram alteradas pela inserção do *gene cry 1Ab*. O fluxo de genes entre variedades contendo o evento MON810 e outras variedades deverá ser semelhante ao que já acontece naturalmente entre as variedades convencionais. No Brasil, onde não há nenhuma espécie silvestre sexualmente compatível com milho, a probabilidade de fluxo gênico para outras espécies é extremamente remota.

O milho (*Zea mays* ssp. *mays*) é sexualmente compatível e cruza livremente com o teosinto (*Zea mays* ssp. *mexicana*) quando florescendo simul-

taneamente e em proximidade física. Esse parente de milho é nativo da América Central e não é encontrado no Brasil. *Tripsacum*, outro gênero filogeneticamente relacionado a *Zea*, contém 16 espécies, das quais 12 são nativas do México e da Guatemala.

Invasibilidade

MON810 não confere nenhuma vantagem competitiva. Assim, é extremamente improvável que o milho ainda que modificado com este evento consiga se estabelecer em ecossistemas silvestres, pois durante o seu processo de domesticação ele perdeu as características típicas de plantas invasoras e colonizadoras, tornando-se dependente do homem para completar seu ciclo de vida no meio ambiente. Todas as evidências experimentais indicam que o milho não sobrevive como uma planta daninha, pois é fraco competidor e possui dispersão de semente muito limitada.

Efeitos adversos secundários

A história de uso e os dados de pesquisa reportados na literatura científica mostram que a proteína Bt não é tóxica a humanos, outros vertebrados e insetos benéficos. A parte ativa desta proteína expressa no milho MON810 (Cry1Ab) é equivalente à proteína microbiana original, amplamente utilizada na agricultura nos últimos 30 anos. Esta proteína só é ativa contra insetos lepidópteros (lagartas).

Linhagens e híbridos de milho que produzem a proteína Cry1Ab foram comparados em experimentos de campo aos seus análogos convencionais (isogênicos). Os dados mostram que a população relativa de artrópodes benéficos foi similar entre os materiais geneticamente modificados e os convencionais. Esses estudos de campo mostraram que Cry1Ab não teve efeito adverso direto ou indireto nas populações de artrópodes benéficas. Foram realizados experimentos de alimentação controlada e com várias espécies de insetos-não-alvo, incluindo abelha melífera, himenópteros benéficos, joaninhas, invertebrados aquáticos e do solo, bem como minhocas. Em todos os casos não houve nenhum efeito adverso sobre essas espécies

estudadas. Em resumo, quando comparado com variedades convencionais de milho, o MON810 não apresentou risco para organismos-não-alvo ou benéficos, inclusive o homem. Portanto, todos os dados experimentais indicam que o milho geneticamente modificado, evento MON810, é seguro sob o ponto de vista ambiental.

Efeito sobre a biodiversidade

O milho não possui nenhuma característica fenotípica nova que promoveria a extensão de seu plantio além das regiões geográficas onde atualmente é cultivado. Como não há nenhum parente silvestre desta leguminosa no Brasil e como esta não é uma espécie invasiva ou colonizadora, a característica resistência a lagartas seguramente não será transferida a outras espécies, modificando a biodiversidade nativa.

Outras considerações

Para se prolongar a efetividade da toxina Bt no milho e nas formulações comerciais, recomenda-se a implementação de Programas de Manejo da Resistência (PRM). Esses programas foram estabelecidos nos países que já cultivam variedades que produzem Bt em seus tecidos, inclusive o milho MON810, e requerem que produtores plantem determinada área com variedades convencionais, faixas de escape ou refúgio, para reduzir a pressão de seleção de insetos resistentes à proteína Bt. Detalhes específicos e exigências dos programas PMR são discutidos no capítulo 10 deste livro.

Algodão resistente a lagartas – Evento 531

A Monsanto desenvolveu uma variedade de algodão geneticamente modificado tolerante às principais pragas da ordem Lepidoptera no Brasil, como o curuquerê (*Alabama argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*). O algodão geneticamente modificado, referido como Algodão Bollgard® evento 531, foi obtido por meio do sistema de transformação de plantas mediado

por *Agrobacterium tumefaciens*. Esse processo resultou na introdução estável de três genes no genoma da variedade convencional Coker 312: *cry1Ac*, o gene neomicina fosfotransferase tipo II (*nptII*) e o 3''(9)-O-aminoglicosídeo adenililtransferase (*aad*). O gene *cry1Ac* é derivado de *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria naturalmente encontrada no solo, que codifica para a produção da proteína Cry1Ac, de ação biocida sobre insetos lepidópteros. Os genes *nptII* e *aad* são derivados da bactéria *Escherichia coli* e codificam para a produção das proteínas NPTII e AAD, respectivamente, conferindo resistência a antibióticos durante as fases iniciais do processo de transformação do algodão. A proteína NPTII confere resistência aos antibióticos aminoglicosilados canamicina e neomicina, funcionando como marcador de seleção de células vegetais transformadas. A proteína AAD confere resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomomicina, funcionando como marcador para a seleção de células bacterianas transformadas. Somente os genes *cry1Ac* e *nptII* são expressos no algodão GM. O gene *aad* é controlado por um promotor bacteriano e a proteína AAD não é detectada no tecido do Algodão Bollgard® evento 531.

Resumo dos elementos genéticos introduzidos

Genes: *cry1Ac*, Cry1Ac deltaendotoxina (*B. thuringiensis subsp. kurstaki* (Btk)); *neo*, neomicina fosfotransferase II (*E. coli* K12); e *aad*, 3''(9)-O-aminoglicosídeo adenililtransferase.

Promotores: E35S, nopalina sintase (*nos*) de *A. tumefaciens* e promotor bacteriano.

Finalizador: 3' poli A da subunidade alfa do gene beta-conglicinina da soja.

Características do algodão

Centro de origem: Meso-americana (Peru, Equador e Bolívia).

Modo de reprodução: Geralmente autógama, com freqüente alogamia, especialmente na presença de insetos polinizadores, como abe-

lhas. Espécies sexualmente compatíveis incluem *G. hirsutum*, *G. barbadense* e *G. tomentosum*.

Características do organismo doador

As características de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* foram anteriormente descritas.

Considerações sobre segurança ambiental

Testes em campo

O Algodão Bollgard® evento 531 vem sendo testado em campo desde 1992 e foi aprovado para produção comercial nos Estados Unidos em 1996. Posteriormente, o produto passou a ser comercializado na Argentina, na Austrália, na África do Sul, na China, na Índia, no México e na Indonésia. No Brasil, testes em campo foram iniciados durante as safras de 1997/1998 e de 1999/2000, com a autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Com exceção da tolerância a insetos-alvo, que resulta da expressão do gene *cry1Ac*, os testes em campo e a experiência em produção comercial indicam que as características fenotípicas e agrônomicas do Algodão Bollgard® evento 531 são equivalentes às de variedades de algodão convencional em comércio.

Estudos foram realizados em laboratório e em campo para a caracterização do Algodão Bollgard® evento 531 e para a determinação da segurança ambiental e alimentar do produto. Os estudos basearam-se no conceito de “familiaridade” acoplado ao conceito de “equivalência substancial” e visaram determinar se a nova planta e seus produtos apresentam um risco novo ou maior do que variedades convencionais para o meio ambiente ou para consumo como alimento para seres humanos e, ou, animais. Os estudos partiram dos conhecimentos sobre a biologia da planta e as práticas agrícolas utilizadas no cultivo do algodão, sobre a origem dos genes inseridos, a função e a segurança das novas proteínas produzidas e sobre a composição nutricional da planta, entre outros aspectos.

Os estudos de caracterização determinaram o DNA inserido, o nível de expressão dos genes inseridos, o fenótipo e o desempenho agrônomo da planta. Os parâmetros analisados não indicam nenhum efeito não-intencional resultante da modificação genética, a qual é herdada pelas gerações subsequentes, sem alterações.

A avaliação da segurança ambiental do Algodão Bollgard® evento 531 mostrou a segurança da planta e das novas proteínas produzidas para organismos-não-alvo e para o meio ambiente. A proteína Cry1Ac, produzida no Algodão Bollgard® evento 531, vem sendo utilizada com segurança como princípio ativo de formulações microbianas já comercializadas no Brasil e em vários países há mais de 40 anos. A proteína é segura para a fauna e para organismos benéficos, degradando-se rapidamente no solo. Não foram encontrados efeitos adversos desta variedade GM ou das proteínas Cry1Ac e NPTII sobre o meio ambiente. O potencial de cruzamento com espécies silvestres presentes no Brasil é possível pela existência de organismos compatíveis, mas improvável nas áreas de plantio comercial. A capacidade invasiva dos genes *cry1Ac* e *nptII* por meio de transferência gênica para organismos não relacionados praticamente inexistente.

Por meio dos estudos de avaliação da segurança alimentar do Algodão Bollgard® evento 531, demonstrou-se que as novas proteínas produzidas pela planta são seguras para a alimentação humana e para a produção de ração animal. As proteínas Cry1Ac e NPTII encontram-se no caroço do Algodão Bollgard® evento 531, mas, após o processamento das fibras e do caroço, elas não são detectadas. Entretanto, caso fossem consumidas, essas proteínas não despertariam nenhuma preocupação com a saúde humana e animal. O modo de ação delas, a especificidade, o histórico de uso e exposição, a rápida degradação no sistema digestivo, a ausência de similaridades com proteínas tóxicas ou alérgicas, assim como a ausência de toxicidade oral aguda em camundongos, mostraram a sua segurança para o consumo humano e animal. A composição, o valor nutricional e a salubridade das frações da planta utilizada como

alimento e, ou, ração são equivalentes às frações das variedades comerciais de algodão convencional. Na verificação da equivalência nutricional e quanto à composicional do Algodão Bollgard® evento 531 em relação às variedades convencionais, utilizou-se a comparação de 67 componentes do caroço de algodão e do óleo. As análises incluíram a determinação dos níveis de proteína, gordura, umidade, calorias, minerais, aminoácidos, ácidos graxos ciclopropenóides e gossipol.

Em adição aos estudos composicionais, a salubridade do caroço do Algodão Bollgard® evento 531 foi demonstrada por meio de estudos de alimentação com ratos, vacas leiteiras, peixes e aves submetidos a dietas que continham o caroço do algodão geneticamente modificado e o do algodão convencional. Esses estudos não mostraram nenhuma diferença significativa entre os animais alimentados com o caroço do algodão GM e os alimentados com o caroço de algodão convencional.

Os principais benefícios observados com o cultivo comercial desta variedade GM, desde a sua comercialização inicial nos EUA e em outros países, são: melhor controle de pragas-alvo, redução do uso de inseticidas, aumento no rendimento, redução dos custos de produção, melhor rentabilidade e menor risco para o produtor. A introdução dessa tecnologia nos Estados Unidos entre 1996 e 1999 levou à redução no uso de ingredientes ativos de inseticidas de aproximadamente 1,2 milhão de quilos. Os produtores obtiveram aumento de 118 milhões de quilos de algodão na produção anual, o que resultou em aproximadamente US\$99 milhões adicionais na receita líquida em 1999. A redução do uso de inseticidas também está associada a uma série de benefícios secundários, como o aumento das populações de insetos benéficos e de animais silvestres, a diminuição da lixiviação potencial de inseticidas e maior segurança para os funcionários da propriedade, devido à menor exposição potencial. Benefícios semelhantes vêm sendo observados em outros países onde essa tecnologia já foi aprovada para uso comercial.

Simulações indicam que os benefícios potenciais que esta tecnologia

trará para o Brasil também podem ser significativos. Caso tivesse sido adotada em 50% da área total cultivada do Brasil em 2000/2001, estima-se que tivesse havido redução de aproximadamente 1 milhão de litros de inseticida e significativa elevação na produtividade.

Outras considerações

O Algodão Bollgard® evento 531 oferecerá aos produtores brasileiros uma nova opção para o manejo da cultura. Os resultados dos estudos de caracterização e de segurança ambiental e alimentar claramente indicam que este Algodão GM é equivalente e tão seguro para o meio ambiente, os organismos-não-alvo, no uso em ração animal e no consumo humano, quanto as variedades convencionais atualmente disponíveis no mercado. As experiências bem-sucedidas com o uso do Algodão Bollgard® evento 531 desde o início de sua comercialização, em 1996, nos EUA, e posteriormente em outros países, confirmam a segurança do produto. Sua utilização em plantios comerciais reduz drasticamente a aplicação de pesticidas convencionais nas lavouras e agrega benefícios econômicos, ambientais, bem como à saúde humana. A adoção dessa tecnologia trará maior competitividade global para a indústria algodoeira do Brasil e agregará benefícios diretos e indiretos semelhantes para o produtor e para o meio ambiente.

Milho tolerante ao glifosato – Evento NK603

A Monsanto desenvolveu o milho NK603 com a característica de tolerância ao glifosato, que é o ingrediente ativo dos herbicidas Roundup®. O NK603 produz proteínas CP4 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS) tolerantes ao glifosato. O controle de plantas daninhas que é realizado pelo glifosato ocorre pela inibição da enzima EPSPS, produzida naturalmente pela planta. Essa enzima catalisa uma etapa crítica na via metabólica do ácido chiquímico para a biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas e microrganismos. As proteínas CP4 EPSPS possuem baixa

afinidade com o glifosato, se comparada com a proteína EPSPS selvagem. Assim, quando o milho NK603, que produz as proteínas CP4 EPSPS, é tratado com glifosato, as plantas continuam se desenvolvendo normalmente. A ação contínua da enzima CP4 EPSPS tolerante ao glifosato catalisa a síntese dos aminoácidos aromáticos necessários ao desenvolvimento normal das plantas. A via biossintética de aminoácidos aromáticos não é encontrada em animais, o que explica a atividade seletiva desse herbicida em plantas, contribuindo para a baixa toxicidade a mamíferos. Dois cassetes para expressão do gene *cp4 epsps* foram introduzidos no genoma do milho por meio de um único inserto, produzindo o milho NK603. O gene *cp4 epsps* é derivado de uma bactéria comum de solo, a *Agrobacterium* sp. cepa CP4, que codifica para a produção da proteína EPSPS, tolerante ao glifosato.

Resumo dos elementos genéticos introduzidos

Gene: *cp4 epsps* (5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase) de *Agrobacterium* sp. cepa CP4.

Promotores: Intron P-ract1/ract1 contendo actina 1 de arroz, CaMV 35S e HSP70 do milho.

Finalizador: *nos 3'*

Características do milho e modo de reprodução

Detalhes sobre as características desta gramínea, bem como seu modo de reprodução, foram anteriormente descritos quando o evento MON810 foi abordado, neste capítulo.

Considerações sobre segurança ambiental

Testes em campo

A segurança ambiental do milho NK603 mostrou-se ser equivalente à do milho convencional, o que foi confirmado em diversos estudos, realizados inclusive no Brasil. A estabilidade genética da característica de tolerância ao glifosato, a ausência de efeitos em organismos-não-alvo, o baixo potencial de transferência gênica, a au-

sência de características que façam com que se torne uma planta daninha, o desenvolvimento e o desempenho agrônomo são fatores que comprovam essa segurança ambiental. Adicionalmente, as observações da segurança do produto utilizado como alimento/ração, desde a liberação comercial do milho NK603 nos Estados Unidos em 2000, e no Canadá e outros países, em 2001, substanciam as afirmativas acima.

A segurança alimentar do milho NK603 foi estabelecida com base em avaliações da atividade da proteína CP4 EPSPS e sua homologia com as proteínas EPSPS presentes em amplo espectro de plantas utilizadas como alimento. A baixa exposição a CP4 EPSPS na dieta, ou seja, baixa concentração no grão e na forragem; a rápida digestibilidade da proteína CP4 EPSPS; e a ausência de toxicidade ou alergenicidade das proteínas EPSPS em geral foram verificadas por meio de estudos com as proteínas CP4 EPSPS produzidas em plantas. A equivalência entre o milho NK603 e o convencional foi demonstrada por meio de análises dos nutrientes-chave, incluindo proteínas, lipídeos, carboidratos, umidade, aminoácidos, ácidos graxos e minerais, em estudos realizados em vários ambientes agrícolas, por exemplo no Brasil. A equivalência nutricional entre a variedade NK603 e o milho convencional foi confirmada mediante avaliação do desempenho alimentar em estudos com frangos de corte, ratos, vacas leiteiras, suínos e gado de corte.

No Brasil, os resultados de estudos de eficácia agrônoma e tolerância, assim como das avaliações agrômicas, de descritores morfológicos, de expressão da proteína CP4 EPSPS e de composição (bromatologia) mostraram que o NK603 é equivalente e tão seguro quanto o milho convencional em termos de biossegurança alimentar e ambiental.

Outras considerações

O milho NK603 tolerante ao glifosato, além de ser tão seguro quanto o convencional, fornece aos agricultores inúmeros benefícios, que incluem: sistema efetivo, flexível e simples para o controle de plantas daninhas na cultura, com potencial para aumento

de produtividade; redução de custos, pela diminuição do uso de produtos herbicidas e do número de aplicações necessárias para o controle efetivo das plantas daninhas; adequação e encorajamento para a adoção de sistemas conservacionistas de cultivo, como o plantio direto; melhoria da qualidade da água em fontes vulneráveis, por reduzir a aplicação de herbicidas que são lixiviados; segurança alimentar e ambiental equivalente à do milho convencional, sendo tão nutritivo quanto este, o que foi demonstrado por meio de diversos estudos específicos com a proteína CP4 EPSPS, análises dos nutrientes-chave, da equivalência nutricional, bem como avaliações ambientais.

Milho resistente a lagartas e tolerante a herbicida – Evento Bt11

As lagartas, pertencentes à família dos Lepidópteros, são as mais sérias pragas da cultura do milho. Além delas, as plantas daninhas, mesmo em baixa densidade, podem reduzir a produtividade do milho de forma significativa. O uso de agroquímicos tem sido o método mais comum de controle das lagartas e das plantas daninhas nesta cultura.

O milho Bt11 foi desenvolvido pela Syngenta com o objetivo de ser resistente às lagartas pela produção de uma proteína inseticida. Esse evento foi obtido com a introdução do gene *Cry1Ab*, à semelhança do milho MON810, apresentado anteriormente. Além da resistência a lagartas, o evento Bt11 apresenta resistência ao glufosinato de amônio, o ingrediente ativo dos herbicidas Liberty, Finale e Basta. O milho Bt11 possui, portanto, o gene *pat*, isolado da bactéria *Streptomyces viridochromogenes*. Esse gene codifica para a produção da enzima fosfinotricina N-acetiltransferase (PAT), a qual confere tolerância ao glufosinato. A enzima PAT do milho Bt11 converte L-fosfinotricina (PPT), o ingrediente ativo do glufosinato de amônio, para uma forma inativa. Na ausência de PAT, a aplicação de glufosinato leva à redução na produção do aminoácido glutamina e ao aumento na produção de amônia nos tecidos da planta, resul-

tando em sua morte. A enzima PAT não possui qualquer efeito tóxico.

Resumo dos elementos genéticos introduzidos

Genes: *pat*, que codifica para a produção da enzima fosfinotricina *N*-acetiltransferase (PAT), proveniente de *Streptomyces viridochromogenes*, e *cry1Ab*, que codifica para a produção da proteína delta endotoxina de *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*

Promotor: CaMV 35S.

Características do milho e modo de reprodução

Detalhes sobre as características desta gramínea, bem como seu modo de reprodução, foram anteriormente descritos quando o evento MON810 foi abordado, neste capítulo.

Características dos organismos doadores

Streptomyces viridochromogenes

É uma bactéria nativa do solo. Suas cadeias de esporos são espiraladas, com coloração azul ou verde, dependendo do pH do meio. *S. viridochromogenes* exibe atividade antimicrobiana devido à estreptomicina produzida pela bactéria. Os dados reportados na literatura indicam sua segurança para o homem, animais e plantas.

Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki

Embora pragas-alvo, tipicamente lagartas, sejam susceptíveis a doses orais da proteína Bt, não há evidências de efeitos tóxicos a mamíferos e pássaros à dose de até 10 µg proteína/g de peso corporal. A proteína Bt tem sido considerada um dos bioinseticidas mais seguros, tanto que é facultado aos agricultores orgânicos o seu uso no controle de pragas.

Considerações sobre segurança ambiental Testes em campo

O milho Bt11 foi testado em vá-

rias linhagens e híbridos de milho em campo a partir de 1992 nos Estados Unidos, no Canadá, na Europa e também no Brasil mais recentemente. Esses experimentos compararam as variedades Bt11 com outras isogênicas convencionais, e detectou-se que características agronômicas, como vigor vegetativo, dias para a maturação, rendimento de grãos, peso e densidade de grãos, foram similares às das variedades não-transgênicas, indicando que no evento Bt11 não foram alteradas as variedades para outras características além da resistência às pragas-alvo. O nível de expressão da enzima PAT nas variedades Bt11 foi suficientemente elevado para conferir tolerância ao herbicida glufosinato. Todos os dados de campo mostram que o milho Bt11 não possui nenhum potencial risco ao ambiente.

Taxa de fecundação cruzada

Os dados de campo também indicaram que a produção, viabilidade, dispersão do pólen e taxa de fecundação cruzada permanecem inalteradas com a modificação genética Bt11. Dessa forma, o fluxo gênico entre variedades Bt11 e outras variedades convencionais será semelhante ao que naturalmente ocorre entre as cultivadas. No Brasil, onde há poucas espécies aparentadas com o milho, a probabilidade de fluxo de gene para espécies silvestres é extremamente remota. O milho *Zea mays* L. subsp. *mays* é sexualmente compatível com outros membros do gênero *Zea*, e em menor grau com algumas espécies do gênero *Tripsacum*.

Invasibilidade

Os genes *pat* e *cry1Ab*, do evento Bt11, não conferiram nenhuma vantagem competitiva ou maior habilidade de sobrevivência para o milho na natureza ou ao aparecimento de características típicas de espécies invasoras e colonizadoras. A tolerância à fosfinotricina só confere vantagem competitiva às plantas pulverizadas com este herbicida. Adicionalmente, nenhuma vantagem competitiva foi conferida pelo gene *cry1Ab*, além da resistência a lagartas-alvo. Essa resistência não transforma, por si mesma, o

milho em uma espécie daninha ou com capacidade de invadir e colonizar o meio ambiente.

Todos os dados experimentais indicam que o milho não sobrevive como uma planta daninha, pois é fraco competidor e possui dispersão de semente muito limitada, portanto não oferece nenhum risco para o meio ambiente.

Efeitos adversos secundários

Foi observado nos ensaios de campo e em laboratório que o milho Bt11 não tem efeito adverso sobre organismos benéficos para os ecossistemas agrícolas. A história de uso registrada na literatura científica mostra que a proteína Bt não é tóxica a humanos, outros vertebrados e insetos benéficos. Estudos de alimentação forçada em laboratório não mostraram nenhum efeito negativo no desenvolvimento de abelhas melíferas, joaninhas e outros insetos-não-alvo. Em estudos com aves alimentadas com milho Bt11 também não se verificou nenhum efeito adverso.

Em resumo, foi determinado que o milho Bt11 não apresenta risco para o meio ambiente e para a saúde humana. Seu efeito é específico para algumas espécies de insetos-praga lepidópteros.

Efeito sobre a biodiversidade

O milho Bt11 não possui nenhuma característica fenotípica nova que fomentaria a extensão de seu plantio além das regiões geográficas que atualmente cultivam esta espécie. Como não há nenhum parente silvestre do milho no Brasil e como esta não é uma espécie invasiva ou colonizadora, a característica resistência a lagartas seguramente não será transferida a outras espécies, modificando a biodiversidade nativa.

Outras considerações

Para a sustentabilidade de uso da toxina Bt expressa no milho e nas formulações comerciais desta mesma toxina, recomenda-se a implementação de Programas de Manejo da Resistência (PRM). Esses programas são obrigatórios nos países que já cultivam

variedades Bt11 e requerem que produtores plantem certa área com variedades convencionais, faixas de escape ou refúgio, para reduzir a pressão de seleção de insetos resistentes à proteína Bt. Detalhes específicos e exigências dos programas PMR são discutidos no capítulo 10 deste livro.

É pouco provável que o milho Bt11 resulte na eliminação do uso de inseticidas químicos que são tradicionalmente aplicados nas lavouras de milho, pois estas variedades são resistentes apenas a algumas das pragas desta espécie. Variedades de milho Bt11 podem, entretanto, contribuir para a preservação do meio ambiente ao oferecer um método alternativo para o controle das lagartas do milho, reduzindo o uso de lagartocidas e os potenciais efeitos adversos resultantes desses inseticidas em insetos benéficos, contribuindo para a segurança do trabalhador e evitando a contaminação da água e do solo.

Milho tolerante a herbicida – Evento T 25

O milho LibertyLink foi desenvolvido pela AgrEvo (hoje Bayer Crop Science) com o objetivo de possibilitar o uso seletivo dos herbicidas cujo ingrediente ativo é o glufosinato de amônio, para o manejo de plantas daninhas. O gene *pat*, que confere este atributo foi clonado de um segmento específico do genoma da bactéria de solo *Streptomyces viridochromogenes* e codifica para a produção da enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT). Este produto encontra-se aprovado na Europa, no Japão, nos Estados Unidos, na Argentina, e sua comercialização ocorre nestes e em outros países.

Resumo dos elementos genéticos introduzidos

Genes: *pat*, que codifica para a resistência ao herbicida fosfinotricina N-acetiltransferase (PAT), e *bla* truncado, que não codifica para a produção de b-lactamase. Cultivos de milho derivado do Evento T25 podem ter suas plantas daninhas manejadas com o herbicida biodegradável glufosinato de amônio, sem entretanto restringir a opção de uso de qualquer outro tradi-

cionalmente utilizado.

Promotor: CaMV 35S

Características do milho e modo de produção

Detalhes sobre as características desta gramínea, bem como seu modo de reprodução, foram anteriormente descritos quando o evento MON810 foi abordado neste capítulo.

Características do organismo doador

Streptomyces viridochromogenes: É uma bactéria nativa do solo. Suas cadeias de esporos são espiraladas, com coloração azul ou verde, dependendo do pH do meio. *S. viridochromogenes* exibe atividade antimicrobiana, devido à estreptomicina produzida pela bactéria. Os dados reportados na literatura indicam sua segurança para o homem, animais e plantas.

Considerações sobre segurança ambiental

Testes em campo

O evento T25 foi estudado em campo a partir de 1992 em diferentes países, inclusive no Brasil. Linhagens e híbridos de milho T25 foram extensivamente avaliados em laboratório, casa de vegetação e no campo. Os experimentos compararam o milho T25 com outros milhos convencionais, quando se determinaram características agrônomicas como produtividade, altura de planta, data de florescimento, suscetibilidade às doenças. Os dados experimentais indicam que o milho T25 é semelhante aos convencionais análogos para todas as características estudadas. Esses dados também mostram que este milho não possui nenhum potencial risco ao ambiente.

Taxa de fecundação cruzada

A produção, viabilidade e dispersão de pólen pelo vento permaneceram inalteradas com a modificação genética T25. Dessa forma, a frequência de intercâmbio gênico entre variedades T25 e outras convencionais deverá ser semelhante à observada

entre variedades não-transgênicas. No Brasil, onde há poucas espécies filogeneticamente relacionadas ao milho no meio ambiente, a probabilidade de fluxo gênico para outras espécies é remota.

Invasibilidade

O gene *pat*, do evento T25, não conferiu nenhuma vantagem competitiva ou maior habilidade de sobrevivência à do milho na natureza ou o aparecimento de características típicas de espécies invasoras e colonizadoras. O fenótipo das plantas T25 permaneceu inalterado para todas as características agrônomicas, exceto para tolerância ao glufosinato de amônio. A tolerância a este herbicida só confere vantagem competitiva às plantas pulverizadas com este produto, portanto dependente de práticas agrônomicas. Essa característica adicionada não transforma, por si mesmo, o milho em uma espécie daninha ou com capacidade de invadir e colonizar o meio ambiente ou áreas não agricultáveis.

Todos os dados experimentais indicam que o milho não sobrevive como uma planta daninha, pois é fraco competidor e possui dispersão de semente muito limitada, portanto não oferece nenhum risco ambiental.

Efeitos adversos secundários

Foi observado nos ensaios de campo e em laboratório que o milho T25 não tem efeito adverso sobre organismos benéficos ou não-alvo nos ecossistemas agrícolas. A enzima PAT, responsável pela tolerância ao glufosinato de amônio, tem atividade enzimática substrato-específica, não possui estabilidade térmica ou proteolítica, típicas de compostos tóxicos, e não afeta o metabolismo da planta. Outras espécies, como soja, arroz, algodão, trigo, cevada, lentilhas, ervilhas, linho e alfafa, foram modificadas para também produzirem a enzima PAT, sem detecção de efeito adverso para o meio ambiente.

Finalmente, após inúmeros testes de biossegurança, foi determinado que o milho T25 não apresenta risco para o meio ambiente nem para a saúde humana.

Efeito sobre a biodiversidade

O milho T25 não possui nenhuma característica fenotípica nova que fomentaria a extensão de seu plantio além das regiões geográficas que atualmente cultivam esta espécie. Como não há nenhum parente silvestre do milho no Brasil e como esta não é uma espécie invasiva ou colonizadora, a característica tolerância ao glufosinato de amônia seguramente não será transferida a outras espécies. Mesmo que o fosse, a característica adicionada não se correlaciona com capacidade adaptativa ou invasiva, portanto sem potencial de modificar a biodiversidade nativa no Brasil.

Foi determinado que o impacto global do milho T25 sobre a biodiversidade vegetal é neutro, bem como sobre a biodiversidade microbiana e animal, uma vez que a enzima PAT, produzida pelo milho T25, não altera o metabolismo da planta e não resulta na produção de compostos secundários novos.

Bibliografia

- Betz, F.S., Hammond, B.G. e Fuchs, R.L. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology* 32: 156-173.
- Borém, A. 2005. Biotecnologia e meio ambiente. Viçosa, MG: UFV. 1. ed. 425 p.
- Borém, A. 2000. Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 10: 101-107.
- Borém, A. 2001. Escape gênico e transgênicos. Rio Branco: Editora Suprema. 204 p.
- Borém, A. 2003. Melhoramento de plantas. Viçosa: Editora UFV. 3. edição 500 p.
- Borém, A. e Ramalho, M.A.P. 2002. Escape gênico e impacto ambiental. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 28: 44-47.
- Borém, A. Freire, E.C., Pena, J.C.V. e Barroso, P.A.V. 2003. Considerations about cotton gene escape in Brazil: a review. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 3: 315-332.
- Costa, N.M.B. e Borém, A. 2003. *Biotecnologia e nutrição*. São Paulo: Editora Nobel. 214 p.
- Freire, E.C., Barroso, P.A.V., Pena, J.C.V. e Borém, A. 2002. Fluxo gênico: análise do caso do algodão no Brasil. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 29: 104-113.
- Giesy, J.P., Dodson, S. e Solomon, K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167: 35-120.
- Hammond, B.G., Vicini, J.L., Hartnell, G.F., Naylor, M.W., Knight, C.D., Robinson, E.H., Fuchs, R.L. e Padgett, S.R. 1996. The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. *Journal of Nutrition* 126: 717-727.
- Harrison, L.A., Bailey, M.R., Naylor, M.W., Ream, J.E., Hammond, B.G., Nida, D.L., Burnette, B.L., Nickson, T.E., Mitsky, T.A., Taylor, M.L., Fuchs, R.L. e Padgett, S.R. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *Journal of Nutrition* 126: 728-740.
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B. e Kishore, G.M. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* 35: 1451-1461.
- Paterniani, E. e Stort, A. C. 1974. Effective maize pollen dispersal in the field. *Euphytica* 23: 129-134.
- Ramalho, M. A. P., Santos, J. B., Pinto, C. A. B. P. 2001. *Genética na agropecuária*. 2.ed. Lavras: UFLA. 472 p.
- Sears, M.K., Hellmich, R.L., Stanley-Horn, D.E., Oberhauser, K.S., Pleasants, J.M, Mattila, H.R., Siegfried, B.D e Dively, G.P. 2001. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Early Edition*
- Sediyama, T., Teixeira, R.C. e Reis, M.S. 1999. Melhoramento da soja. In: Borém, A. (ed.) *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Editora UFV. p. 488-533.
- Stanley-Horn, D.E, Dively, G.P., Hellmich, R.L., Mattila, H.R., Sears, M.K., Rose, R., Jesse, L.C.H., Losey, J.E., Obrycki, J.J. e Lewis, L. 2001. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Early Edition*.
- Taylor, N.B., Fuchs, R.L., MacDonald, J., Shariff, A.R. e Padgett, S.R. 1999. Compositional Analysis of Glyphosate-Tolerant Soybeans Treated with Glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4469-4473.
- Teshima, R., Akiyama, H., Okunuki, H., Sakushima, J., Goda, Y., Onodera, H., Sawada, J., Toyoda, M. 2000. Effect of GM and non-GM soybeans on the immune system of BN rats and B10A mice. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 41: 188-193.
- U.S. EPA. 1993. Reregistration Eligibility Decision (RED): Glyphosate. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- WHO. 1994. Glyphosate. World Health Organization (WHO), International Programme of Chemical Safety (IPCS), Geneva. *Environmental Health Criteria No. 159*.
- Williams, G.M., Kroes, R. e Munro, I.C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31: 117-165.
- Windels, P., Taverniers, I., Depicker, A., Van Bockstaele, E. e De Loose, M. 2001. Characterization of the Roundup Ready soybean insert. *Eur. Food Res. Technol.* 213: 107-112.