

# Biotecnologia de Alimentos

• João Roberto Oliveira do Nascimento • Franco Maria Lajolo

## Objetivos

Este capítulo tem por objetivo apresentar conceitos básicos relativos à biotecnologia de alimentos, com ênfase no desenvolvimento de matérias-primas vegetais derivadas de organismos geneticamente modificados. As principais etapas envolvidas no desenvolvimento desses alimentos, assim como alguns exemplos de variedades de plantas com benefícios agrônômicos ou nutricionais, são apresentados. Ao final são discutidas questões relativas à segurança e à rotulagem desses alimentos.

## Introdução

A biotecnologia pode ser conceituada, de modo bastante abrangente, como o conjunto de tecnologias de manipulação de seres vivos, tecidos ou organelas para obtenção de produtos ou processos de alguma utilidade.

No contexto alimentar, exemplos típicos de produtos biotecnológicos são os alimentos obtidos por fermentação, como queijo, vinho, pão e cerveja. Nesses casos, o processo natural de fermentação microbiana é utilizado com o propósito de modificar a composição química e características sensoriais de matérias-primas alimentares. A inoculação e o desenvolvimento de micro-organismos específicos leva ao consumo de substratos, sobretudo açúcares, e consequente formação de produtos da fermentação, como ácidos orgânicos e etanol, que além de terem ação autolimitante sobre o crescimento do micro-organismo fermentador dificultam ou retardam o crescimento de micro-organismos deteriorantes. Portanto, uma matéria-prima como o suco de uvas, extremamente perecível por ser rico em açúcares e outros nutrientes, é convertido em vinho, pelo acúmulo de etanol derivado da fermentação, resultando em um produto que pode ser armazenado à temperatura ambiente por longos períodos.

A manipulação de seres vivos com a finalidade de melhor atender às necessidades alimentares humanas é algo que acompanha a história da civilização, e não se restringiu à obtenção pura e simples de alimentos por fermentação. Não bastou às populações ancestrais fazerem uso deliberado de micro-organismos específicos para conservar matérias-primas perecíveis ou sazonais e, conseqüentemente, dispor de seus nutrientes por períodos mais longos. Empiricamente foram identificados e selecionados os micro-orga-

nismos mais adequados às demandas humanas por maior produtividade, resistência a condições adversas e armazenamento, e também que resultassem em produtos com melhores características organolépticas, como gosto e aroma. Da mesma maneira, a manipulação de seres vivos para melhor atender às necessidades humanas não se restringiu a seres unicelulares.

O desenvolvimento da agricultura e da pecuária mostra clara manipulação das características observáveis ou mensuráveis (fenótipo) de seres mais complexos, como plantas e animais, com a finalidade última de satisfazer às demandas populacionais por alimentos. Plantas foram selecionadas por sua produtividade, maior resistência a pragas ou intempéries, pelo valor nutricional, ou pela segurança para consumo, traduzida por níveis reduzidos de compostos indesejáveis, sejam tóxicos ou antinutricionais. De modo análogo, animais foram selecionados por sua carne, porte, resistência a doenças, temperamento tolerante ao manejo humano, e pelo ciclo reprodutivo compatível com as condições de cativeiro, dentre outras características.

Essa manipulação empírica, conduzida e aprimorada ao longo de milênios em várias partes do globo, baseada no intercâmbio de espécies, no cruzamento de indivíduos selecionados e na fixação de características de interesse, resultou na grande diversidade de espécies e variedades de animais e plantas atualmente utilizadas como matérias-primas alimentares.

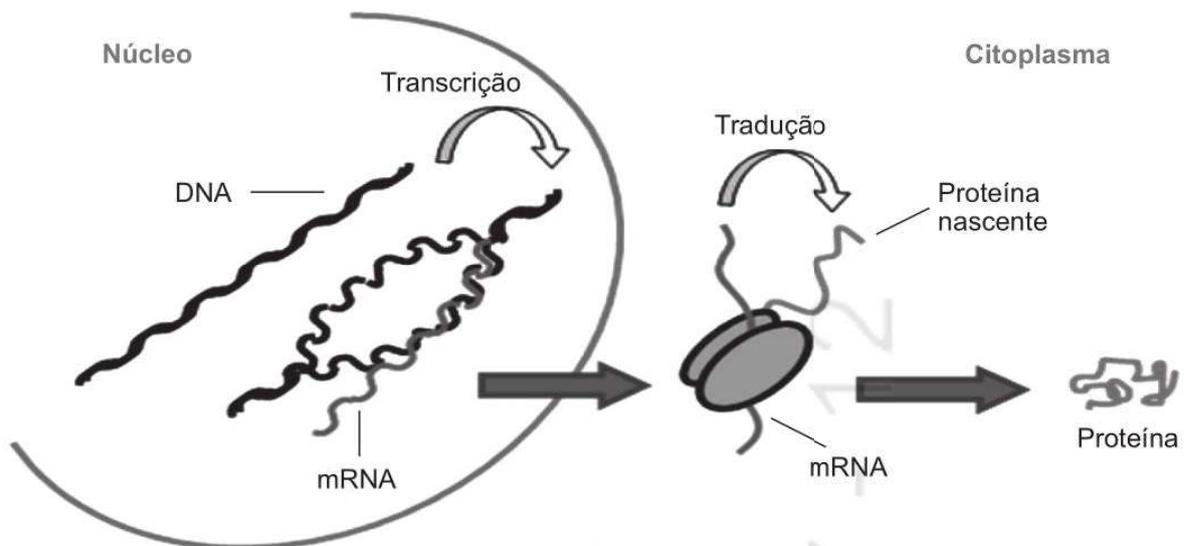
O melhor entendimento da base genética por trás de várias características de interesse em animais e plantas utilizados com alimentos ajudou a direcionar o aprimoramento dessas espécies. Portanto, novas variedades de animais e plantas utilizadas com matérias-primas alimentares foram desenvolvidas por meio do que se convencionou chamar melhoramento genético convencional. Nesse caso, as características de interesse são buscadas em meio ao acervo genético disponível na espécie, pela observação e triagem acurada de indivíduos, e também por meio de cruzamentos programados, com seleção da progênie resultante. No caso das espécies vegetais, processos como a mutação induzida por agentes químicos e por radiação ionizante foram bastante utilizados, sobretudo em meados do século XX, resultando em variedades amplamente utilizadas como alimentos. A importância da abordagem mutagênica para a obtenção de variedades de interesse pode ser ilustrada, no Brasil, pela criação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), que tinha entre suas atribuições originais empregar a radiação ionizante como elemento indutor de mutações para a obtenção de variedades de plantas com características agrônômicas superiores.

Em que pese o sucesso dessas abordagens na obtenção de variedades de animais e plantas, o fato é que o processo de melhoramento convencional apresenta limitações em razão da natureza das modificações genéticas efetuadas. O cruzamento de indivíduos, por meio da reprodução sexuada, resulta em um embaralhamento genético que torna pouco previsível a manifestação das características agrônômicas de interesse. Da mesma maneira, os processos de mutação química ou por radiação são inespecíficos, afetando um grande número de genes, e eventualmente os potencialmente relevantes. Dessa forma, o melhoramento genético convencional pode ser considerado um processo de manipulação de características genéticas com um significativo grau de imprevisibilidade, de difícil controle, e bastante afetado pelos limites impostos pela reprodução sexuada ou pela disponibilidade da característica de interesse no acervo genético da espécie.

## **Expressão gênica**

Tendo sido apresentada a importância que a genética tem para as características de interesse em animais e plantas utilizadas com alimentos, é oportuno destacar alguns aspectos do processo de expressão dos genes.

A informação genética de um organismo está compilada em seu genoma, fisicamente representado pelos pares de cromossomos. Estes são estruturas presentes nas células de procariotos e eucariotos (células com núcleo), constituídos por fitas duplas de DNA – a molécula carreadora da informação gênica. Os genes são segmentos das fitas duplas de DNA que representam unidades de informação genética, levando à síntese de proteínas. Essas proteínas podem desempenhar



**Figura 10.1** Esquema ilustrativo das etapas da expressão gênica em um organismo eucarioto com material genético no núcleo.

as mais diversas funções, estruturais, catalíticas, de defesa, regulatórias, dentre outras, levando à manifestação da respectiva característica codificada pelo gene.

O fluxo da informação genética se propaga na direção da formação de proteínas, passando pelas etapas de transcrição e tradução, de acordo com a Figura 10.1. Na transcrição, a informação contida no DNA é repassada a uma molécula de RNA mensageiro (mRNA), por meio de uma RNA polimerase. Essa molécula de mRNA consiste numa fita simples de nucleotídeos que serve de molde para a síntese de proteínas, no processo conhecido por tradução.

A tradução de proteínas se dá pela interação das moléculas de mRNA com os ribossomos e a participação de pequenas moléculas de RNA transportador (tRNA), que são os carreadores de aminoácidos. No ribossomo, ocorre a junção dos aminoácidos e a síntese da proteína, a partir da sequência predeterminada pelo mRNA, que por sua vez deriva da informação contida no DNA. As proteínas podem ainda sofrer modificações adicionais depois da tradução, como, por exemplo, pela remoção específica de parte de sua sequência de aminoácidos, pela adição de grupos, como carboidratos ou fosfato.

O conhecimento sobre o fluxo da informação gênica proporcionou a base para o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, que possibilitou a manipulação dos genes dos organismos.

## **A tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento de alimentos**

Os significativos avanços trazidos pela elucidação da estrutura do DNA e pelas técnicas de manipulação de ácidos nucleicos resultaram na chamada tecnologia do DNA recombinante, em que moléculas de DNA de um organismo podem, de maneira bastante específica e precisa, ser isoladas, fragmentadas e recombinadas, copiadas e transferidas de um organismo a outro por via assexuada, tornando possível, inclusive, a transferência de genes entre espécies. O entendimento de que o código genético é uma base de informação universal entre os seres vivos, assim como os avanços técnicos que resultaram na reação em cadeia da polimerase (PCR), e no sequenciamento em larga escala que possibilita a descrição de genomas completos, possibilitaram levar a capacidade de manipulação de sequências gênicas a um nível sem precedentes. A tecnologia do DNA recombinante, ao possibilitar a modificação das características de um organismo em um grau mais apurado, por meio da manipulação genética mais precisa e direta, forma a base da chamada transgenia.

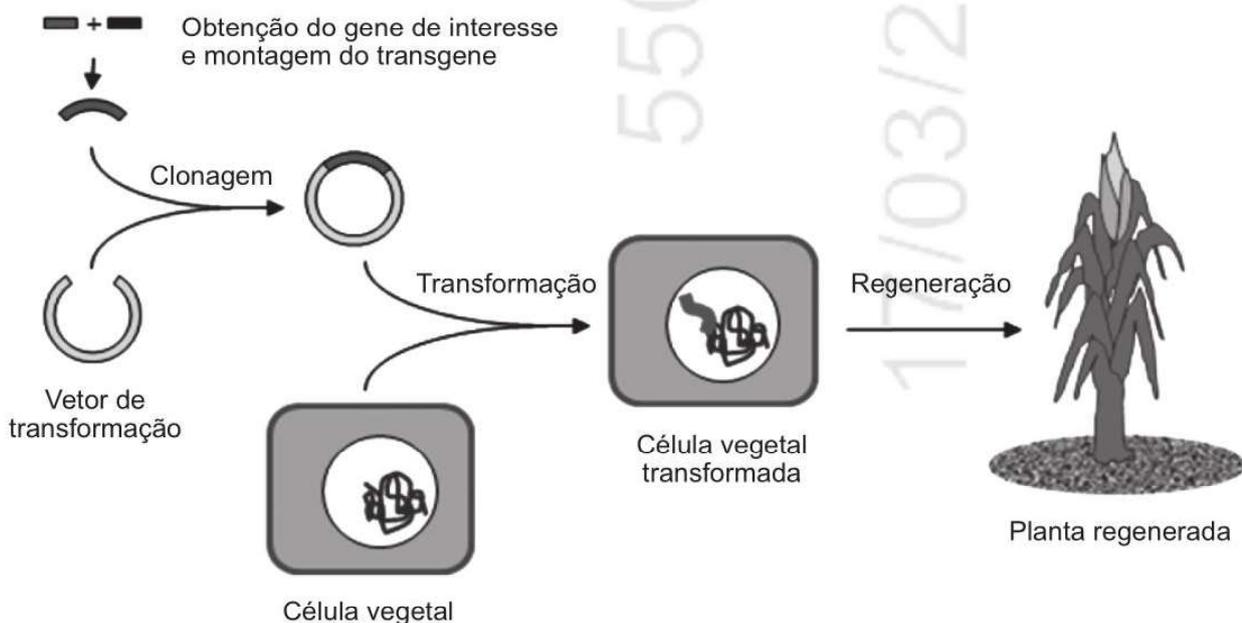
A produção de novas variedades de animais e plantas de interesse agrônomo é um importante capítulo da biotecnologia moderna, sendo os alimentos geneticamente modificados (GM) a face mais em evidência. Um alimento geneticamente modificado pode ser definido como aquele derivado de um animal ou planta que passou por um processo de modificação genética, com introdução, remoção ou modificação de sequências gênicas, originadas da mesma espécie ou de outra, por meio da tecnologia do DNA recombinante, com a finalidade de conferir características desejáveis do ponto de vista agrônomo e industrial ou benefícios diretos para o consumidor final. Em que pese o fato de que no melhoramento convencional também ocorre o desenvolvimento de organismos com características genéticas de interesse, o termo geneticamente modificado é restrito àqueles alimentos obtidos por transgenia, ou seja, derivados da manipulação de sequências gênicas por técnicas de DNA recombinante.

## Etapas do desenvolvimento de novas matérias-primas alimentares

O desenvolvimento de novas matérias-primas alimentares por transgenia (Figura 10.2) resulta da combinação de êxitos nas seguintes etapas técnicas: 1) identificação do determinante genético da característica fenotípica de interesse; 2) manipulação *in vitro* e obtenção das novas sequências gênicas; 3) transferência das novas moléculas de DNA para células do organismo receptor; 4) regeneração de organismos viáveis a partir das células modificadas; 5) seleção do organismo modificado com manifestação da característica de interesse. Os detalhes dessas etapas são discutidos a seguir.

### Identificação do determinante genético da característica fenotípica de interesse

A etapa de identificação do determinante genético por trás da característica fenotípica de interesse é essencial para o sucesso no desenvolvimento de um alimento GM, pois do conhecimento dos genes envolvidos depende a subsequente manipulação das sequências. Essa etapa é resultante do acúmulo de uma grande quantidade de informação biológica, em geral obtida a partir de estudos básicos de fisiologia, bioquímica, genética e biologia molecular. Se, por exemplo, pretende-se desenvolver uma variedade vegetal com níveis aumentados de um determinado nutriente, é preciso, antes de tudo, conhecer as rotas metabólicas que levam à sua síntese, identificar os genes



**Figura 10.2** Esquema ilustrativo das etapas de desenvolvimento de uma planta geneticamente modificada.

responsáveis e os fatores ou condições que modulam a sua expressão. Ao final, espera-se que o gene determinante para a expressão da característica seja inequivocamente identificado e que haja suficiente conhecimento sobre a regulação de sua expressão.

### Manipulação *in vitro* e obtenção das novas sequências gênicas

Uma vez definido o gene que será modificado para a obtenção da variedade geneticamente modificada, é necessário proceder à sua manipulação *in vitro*. A expressão de um gene depende da presença de elementos gênicos regulatórios, como a sequência promotora e a sequência terminadora, além de outros motivos envolvidos com a destinação subcelular da proteína produzida, como as sequências de peptídeo-sinal ou de peptídeo de trânsito, por exemplo. A região promotora apresenta os elementos necessários para o início da transcrição do respectivo mRNA, e geralmente apresenta motivos ou trechos de interação com fatores de transcrição, os quais são capazes de modular o processo de transcrição. A região terminadora determina o fim do processo de transcrição e, portanto, o tamanho da molécula de mRNA produzida pela RNA polimerase.

A modificação genética capaz de conferir uma característica de interesse envolve a manipulação de trechos de DNA originados de diferentes organismos, de modo a resultar numa sequência gênica que seja efetivamente expressa. Essas diferentes moléculas de DNA devem ser manipuladas e ordenadas numa sequência funcional, perfazendo o que se convencionou chamar construção, transgene ou cassete de transformação. Na Figura 10.3, é apresentado esquema do transgene de uma soja GM. Na montagem dessa nova molécula de DNA são necessárias, além da região codificadora dos aminoácidos, as regiões promotoras e terminadoras e, eventualmente, trechos de DNA responsáveis pela destinação subcelular da proteína produzida. Essa nova construção gênica, produzida com as técnicas de DNA recombinante, pode ser montada num vetor de transformação, que consiste numa molécula circular de DNA, derivada de segmentos de plasmídeos e DNA de vírus bacteriófagos, para posterior transferência para o organismo hospedeiro. Em geral, a montagem da construção de interesse no vetor de transformação é associada a um gene marcador, que pode ser um gene que propicia ao organismo receptor resistência a um determinado antibiótico. A finalidade do gene marcador é indicar a presença do transgene no organismo receptor, uma vez que, por estarem montados no vetor, ambos serão despachados para as células durante o processo de transformação. A utilização de um gene marcador se faz necessária porque nem sempre a característica de interesse, conferida pelo transgene, pode ser manifestada em etapas iniciais do trabalho, em que são manipuladas apenas células e não um organismo complexo, como uma planta ou animal.

Transgene da soja com resistência ao glifosato



- E35S = promotor da transcrição do vírus do mosaico da couve-flor
- CTP4 = sequência de endereçamento para cloroplasto
- CP4EPSPS = enzima fosfoenol piruvato shiquimato sintase
- NOS = terminador da transcrição da nopalina sintase

**Figura 10.3** Representação esquemática da composição do transgene da soja resistente ao glifosato.

## **Transferência das novas moléculas de DNA para células do organismo receptor**

Uma vez que o transgene foi preparado com todos os elementos necessários para a expressão da proteína de interesse em um vetor de transformação, deve ser feita a sua introdução em células do organismo hospedeiro. Ao processo de transferência dessa nova molécula de DNA a células hospedeiras, com passagem para o núcleo e integração no genoma, dá-se o nome de transformação. No âmbito da produção de novas matérias-primas alimentares, esse processo pode ser feito por método físico ou biológico. A escolha de um ou outro depende em grande medida do material biológico objeto da transformação, pois alguns são eficientemente transformados por um método, mas não por outro.

### **Transformação por biobalística**

A transferência das novas moléculas de DNA para células do organismo receptor por método físico diz respeito ao uso da biobalística. Nesse caso, as moléculas de DNA da construção ou transgene são adsorvidas na superfície de micropartículas de material inerte, com tungstênio ou ouro, e aceleradas contra células ou tecido do organismo a ser modificado geneticamente. Essa aceleração se dá em um equipamento específico, por meio do disparo de uma carga de gás comprimido, de modo que as partículas ao serem disparadas em alta velocidade penetrem nas células e possam alcançar o núcleo. Nessa organela, as moléculas de DNA são liberadas das partículas e, por meio de recombinação aleatória, podem se integrar ao material genético do organismo alvo da transformação.

Nesse processo, muitas células são danificadas e mortas, mas uma parcela pode receber o novo material genético sem grandes danos. Dentre essas células receptoras das partículas carreando DNA, algumas poderão ter o material genético integrado em posições no genoma que não comprometam severamente suas funções biológicas, havendo a possibilidade de expressão do transgene.

### **Transformação por agrobactéria**

O método de transformação genética por agente biológico diz respeito ao uso do micro-organismo *Agrobacterium tumefaciens*. Essa bactéria do solo é capaz de infectar tecidos vegetais, com transferência de material biológico para as células hospedeiras, que passam então a se multiplicar e a produzir opinas, aminoácidos não proteicos que não são utilizados pelo vegetal, mas que podem ser metabolizados pelo micro-organismo. Esse é um processo natural de patogenia vegetal que leva à formação de deformidades nos tecidos, normalmente conhecidas por galha de coroa em caules e raízes, cujo elemento chave é um plasmídeo presente nas células da agrobactéria.

O processo biotecnológico de transformação vegetal por meio da agrobactéria lança mão de um fenômeno que ocorre na natureza – a eficiente transferência de material genético do micro-organismo para a célula vegetal, com a diferença que os genes presentes no plasmídeo são previamente manipulados *in vitro*. O plasmídeo é modificado pelas técnicas de recombinação, de modo que a região do DNA de transferência contendo os genes relacionados com a biossíntese de opinas e hormônio vegetal é substituída pelo transgene. Assim, em vez de indução de um tumor vegetal capaz de produzir o alimento da agrobactéria, ocorre a transferência e integração dos genes presentes na construção genética no genoma do vegetal.

### **Regeneração de organismos viáveis a partir das células modificadas**

Uma vez que o transgene tenha sido transferido, seja carregado em partículas veiculadas por biobalística, seja por intermédio da agrobactéria, é necessário identificar quais dessas células o receberam e o tiveram integrado em seu genoma. Nessa etapa do trabalho, as células transformadas são cultivadas em meio seletivo, ou seja, em meio de cultura contendo um agente químico para o qual o gene marcador confere resistência. Esse agente pode ser um antibiótico, herbicida,

ou algum metabólito específico, e a sobrevivência das células transformadas indica a presença do transgene integrado ao genoma, pois na montagem da construção o gene de interesse foi associado ao gene marcador.

A seleção das células transformadas possibilita passar à próxima etapa do processo, que é a regeneração de organismos viáveis. A princípio, as células são individualmente cultivadas em meio nutritivo adicionado do agente de seleção para que haja multiplicação e formação de uma massa de células indiferenciadas. Frações da biomassa originada de uma única célula transformada são então transplantadas para meio nutritivo adicionado de hormônios vegetais. Do balanço entre esses hormônios são criadas as condições que propiciam a indução do desenvolvimento de raízes e caules. A manipulação das condições de cultura dos tecidos resulta na formação de uma plântula, que ao ser adequadamente adaptada a condições ambientais mais severas pode resultar numa planta com plena capacidade de ser cultivada em condições de campo.

### **Seleção do organismo modificado com manifestação da característica de interesse**

Feita a regeneração das plantas transformadas, é necessário não apenas identificar aquelas que receberam o transgene mas também as que são capazes de expressar a nova característica de interesse, sem, no entanto, perda de suas qualidades agrônômicas. Isso se justifica pelo caráter aleatório da integração no genoma, fazendo com que a modificação genética possa resultar na incorporação do transgene em uma posição desfavorável do genoma, causando a interrupção de sequências gênicas que podem de algum modo comprometer a viabilidade da planta em condições de campo, ou prejudicar o seu crescimento e produtividade.

A transferência e integração do material genético em uma célula compõem um evento único, em que a probabilidade de ocorrência idêntica em outra célula transformada é bastante baixa. Diante disso, os experimentos de transformação partem de um número relativamente grande de indivíduos para a triagem, de modo que possa ser encontrado um indivíduo que apresente o melhor compromisso entre a manifestação da nova característica introduzida pela modificação genética e a preservação das qualidades agrônômicas. Para isso, a identificação de um evento de transformação que possa resultar numa variedade geneticamente modificada depende da avaliação de seu desempenho em condições de cultivo comercial, estando sujeito às condições ambientais reais, ou seja, intempéries, insetos, micro-organismos etc. Deve ser avaliada não só a manifestação da nova característica de interesse como, por exemplo, a resistência a insetos, mas também se foi preservada a taxa de crescimento, o porte, a produtividade etc.

### **Variedades vegetais com vantagens agrônômicas ou tecnológicas**

As variedades da primeira geração de geneticamente modificados foram desenvolvidas, em sua maioria, com o objetivo de prover matérias-primas alimentares com propriedades tecnológicas ou características agrônômicas superiores a de seus análogos convencionais. Um exemplo clássico é o tomate, que apresenta significativas perdas pós-colheita em razão da polpa extremamente macia quando maduro. Uma vez que as características organolépticas ou tecnológicas mais valorizadas, como cor, gosto e aroma, são alcançadas quando a fruta está madura e, portanto, mais frágil e susceptível a injúrias, a colheita do fruto plenamente maduro resultaria em um produto de qualidade superior, mas com alto grau de perecibilidade. Desse modo, foi desenvolvida uma variedade de tomate com uma modificação genética para suprimir a expressão do gene da poligalacturonase (PG), uma enzima que atua sobre a pectina, um polímero da parede celular vegetal que contribui para a firmeza do tecido vegetal. O bloqueio da expressão dessa enzima durante o amadurecimento do tomate resulta num fruto mais firme, que pode ser colhido maduro, mais tardiamente, e, portanto, com as características desejáveis de cor e sabor plenamente desenvolvidas. Essa variedade de tomate recebeu o nome fantasia de “Favr-Savr” e tem valor histórico por ter sido o primeiro produto vegetal geneticamente modificado com aprovação para consumo hu-

mano nos EUA, em 1994. Embora a expressão do gene da PG tenha sido inibida em 98%, ainda assim houve algum amaciamento da polpa, o que, no entanto, não impediu que o tomate pudesse permanecer na planta por mais tempo e a polpa derivada desses frutos apresentasse propriedades reológicas distintas.

Dois exemplos bastante importantes de estratégias de modificação genética visando à obtenção de vantagens agrônômicas são as variedades de plantas resistentes a herbicidas e aquelas que expressam proteínas inseticidas, algumas das quais já autorizadas para plantio e comercialização no Brasil.

A soja resistente ao herbicida glifosato foi a primeira variedade geneticamente modificada liberada para cultivo comercial no país. Essa variedade diferencia-se da convencional por ter recebido uma variante do gene da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que é insensível ao herbicida. Plantas que são mortas pelo glifosato sofrem os efeitos nocivos justamente pelo fato de essa enzima, responsável pela biossíntese de aminoácidos aromáticos, ser inibida pelo herbicida. No caso das plantas resistentes, a presença de uma versão do gene EPSPS insensível à inibição, introduzida pela modificação genética, garante a biossíntese dos aminoácidos, ainda que a enzima original seja prejudicada pela presença do composto. Desse modo, a aplicação do herbicida leva as ervas-daninhas ou mesmo soja convencional à morte, mas não causa prejuízo às variedades geneticamente modificadas. Hoje em dia, já existem diversos vegetais com esse tipo de resistência ou similares aprovados para cultivo. No Brasil, há variedades comerciais aprovadas de soja, milho e algodão.

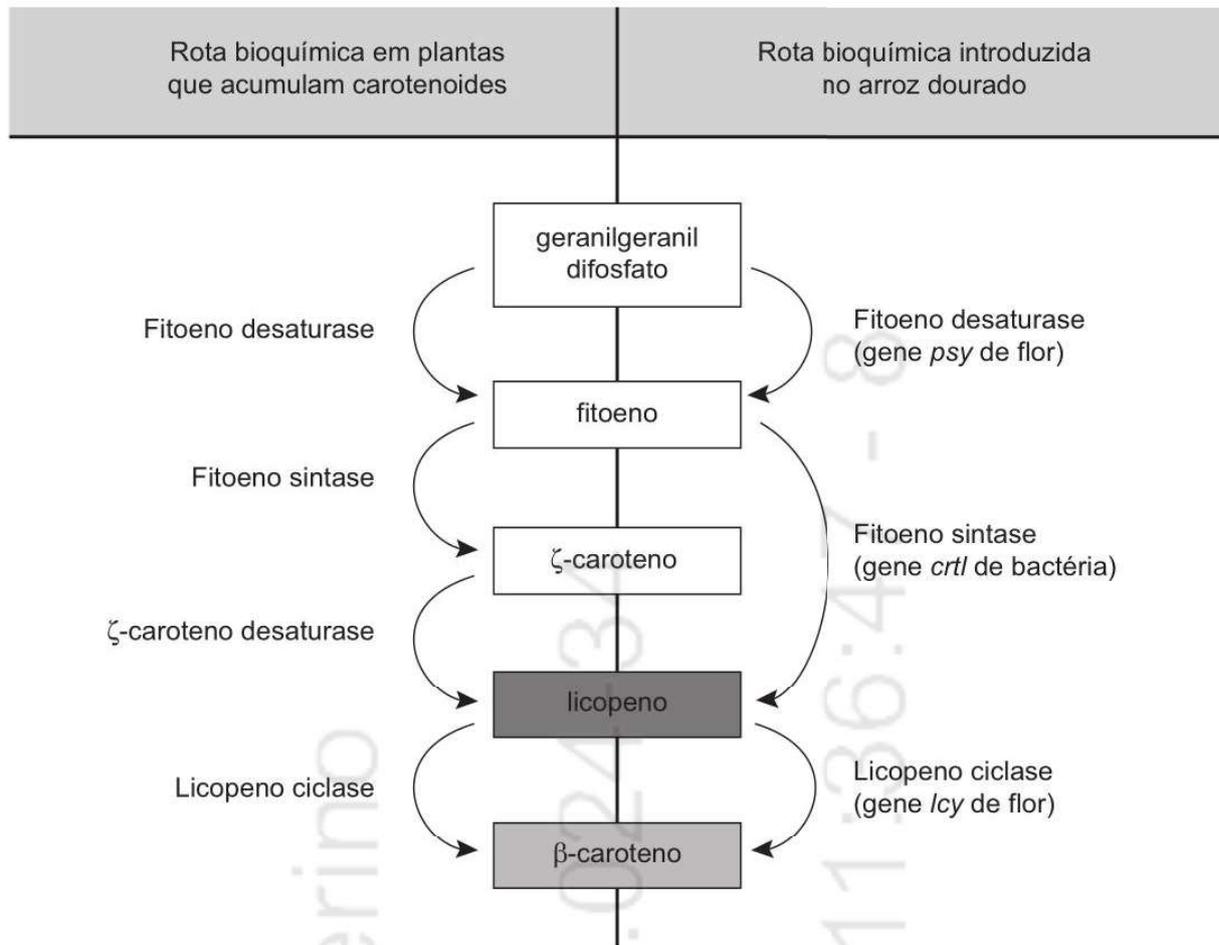
O ataque de insetos causa prejuízos significativos às lavouras de diversas culturas e há grande interesse em controlar a proliferação dessas pragas. Um controle eficiente pode ser alcançado por meio da introdução nas plantas de genes que codificam proteínas com ação tóxica apenas sobre insetos, mas não sobre seres humanos e outros animais. Existem proteínas produzidas pelo micro-organismo *Bacillus thuringiensis*, conhecidas pelas siglas CryI (CryIAa, CryIAb, CryIAc), que têm ação inseticida especificamente sobre larvas de borboletas e mariposas que infestam as lavouras. As plantas das variedades conhecidas como *Bt*, ou seja, resistentes por expressarem proteínas de *Bacillus thuringiensis*, dispensam a aplicação de inseticidas químicos e são nocivas apenas aos insetos que delas se alimentam. Assim como para a resistência a herbicidas, há no Brasil variedades de milho, soja e algodão com a característica *Bt* aprovadas para cultivo.

## **Variedades vegetais com vantagens nutricionais ou funcionais**

Embora as plantas modificadas para obtenção de vantagens agrônômicas sejam uma realidade em vários países, o futuro aponta para o crescimento de novas variedades, capazes de proporcionar benefícios para o consumidor final em termos nutricionais. Exemplos dessa nova geração de alimentos geneticamente modificados são: o arroz dourado e as variedades de soja com modificação da composição de seu óleo, dentre outros.

O arroz dourado vem a ser uma variedade do cereal, desenvolvida por pesquisadores das universidades de Zurique (Suíça) e Freiberg (Alemanha), capaz de produzir  $\beta$ -caroteno (provitamina A), o que explica sua denominação, em razão da marcante mudança de cor dos grãos de branco para amarelo-laranja.<sup>1</sup> A produção do pigmento foi conseguida por meio da introdução dos genes das enzimas fitoeno sintase e licopeno ciclase (obtidas de uma flor) e fitoeno desaturase (obtida da bactéria *Erwinia uredovora*), que a partir dos precursores disponíveis proporcionaram a síntese de  $\beta$ -caroteno (Figura 10.4). Posteriormente, uma nova versão do arroz dourado foi obtida com a introdução da fitoeno sintase de milho, resultando num teor de carotenoides superior ao da primeira versão do arroz.<sup>2</sup>

O consumo do arroz dourado representa uma importante arma no combate à deficiência de vitamina A na dieta em razão do aumento da ingestão de  $\beta$ -caroteno (Capítulo 6). Contudo, a importância desse grão para o combate à desnutrição vai além do arroz dourado, pois sendo um alimento consumido por quase metade da população mundial, e relativamente deficiente em



**Figura 10.4** Representação esquemática parcial da biossíntese de carotenoides em plantas até a etapa de produção de  $\beta$ -caroteno, e rota de síntese do  $\beta$ -caroteno em arroz dourado resultante da introdução de três genes exógenos.

alguns nutrientes, oferece a possibilidade de biofortificação pela transgenia. Abordagens biotecnológicas voltadas para a melhoria do valor nutricional do arroz envolvem o desenvolvimento de variedades com maiores teores de folato, ferro e aminoácidos essenciais, como metionina, cisteína, lisina e o triptofano.

Há grande interesse na modificação da composição de óleos vegetais de modo a proporcionar vantagens nutricionais ou menor exposição a compostos nocivos decorrentes do processamento, como os produtos da oxidação e os ácidos graxos *trans*. Nesse sentido, vários tipos de modificação genética de soja podem contribuir para que esse objetivo seja alcançado.

Uma soja transgênica com alto teor de um ácido graxo  $\omega$ 3 polinsaturado de cadeia longa, o ácido estearidônico-(SDA) (18:4(n-3)), que é um intermediário metabólico na conversão do ácido linolênico em ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5(n-3)) e ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6(n-3)), foi considerada segura para consumo pela FDA (Food and Drug Administration), a agência americana responsável pela regulamentação de alimentos e medicamentos. O consumo desse óleo pode ser uma importante contribuição para a redução do risco de desenvolver doenças cardiovasculares, como alternativa ao consumo de óleo de peixe (fonte abundante de  $\omega$ 3), pois proporciona aumento dos níveis de EPA nos eritrócitos. No organismo humano, ocorre síntese de EPA a partir de outro ácido da classe  $\omega$ 3, o linolênico, mas isso se processa muito mais eficientemente a partir do SDA.

O melhor desempenho do óleo de soja frente ao processamento térmico pode ser conseguido pela modificação genética levando ao menor teor de ácido linolênico (C18:3,  $\Delta$ 9,12,15), ou maiores teores de ácido oleico (C18:1,  $\Delta$ 9), que possibilitam maior estabilidade à oxidação

lipídica. Outra vantagem importante das modificações do perfil de ácidos graxos pode ser também a menor ingestão de gorduras saturadas e o aumento de gorduras mono- e poli-insaturadas, consideradas mais saudáveis. Enquanto os óleos produzidos a partir de variedades convencionais de soja contêm 24% de ácido oleico, nos EUA e Canadá existem óleos derivados de variedades geneticamente modificadas que fornecem óleo com 80% desse ácido graxo.

Uma importante contribuição da modificação da composição de óleos por transgenia pode ser também a menor ingestão de ácidos graxos *trans*. Além disso, nos EUA e Canadá já existe disponível um óleo de canola com alto teor de ácido esteárico, o que diminui a necessidade de hidrogenação de óleo para a obtenção de gordura, amplamente utilizada na indústria de alimentos.

## Segurança de alimentos geneticamente modificados

Novas tecnologias provocam dúvidas e por isso despertam desconfianças nos consumidores, e com os alimentos geneticamente modificados a situação não é diferente. Contudo, a preocupação com a garantia da segurança das matérias-primas alimentares derivadas da moderna biotecnologia está presente nas várias etapas de seu desenvolvimento, da concepção da ideia da nova variedade vegetal até a fase de aprovação para cultivo comercial e liberação para consumo humano.

Em essência, todo o trabalho de desenvolvimento é feito não apenas para que haja a expressão da nova característica, com a necessária preservação das qualidades agrônômicas da variedade parental, mas sobretudo que o produto final se mostre seguro para o ambiente e para o consumidor. A nova variedade derivada da modificação genética deve apresentar um nível de segurança similar ao da variedade convencional que lhe deu origem. Para isso, é necessário que os potenciais efeitos nocivos associados ao consumo dessa nova variedade sejam avaliados e as probabilidades de ocorrência sejam estimadas, de modo que o risco oferecido seja considerado aceitável por ser similar ao oferecido pela variedade parental. Assim, os alimentos geneticamente modificados são avaliados segundo o processo de análise de risco, que consiste na busca sistemática de informações científicas sobre um determinado efeito adverso, de modo a avaliar o risco envolvido e tornar possível a adoção de medidas para eliminar ou controlar sua ocorrência.

Os potenciais riscos das matérias-primas alimentares derivadas da transgenia, e que são objeto de avaliação científica durante seu desenvolvimento e aprovação para consumo, estão relacionados com a possibilidade de ocorrência de efeitos não intencionais da modificação genética. Esses efeitos não previstos, e eventualmente indesejáveis, podem resultar do fato de que a moderna biotecnologia, apesar de ser um avanço significativo em relação ao melhoramento genético convencional, pois ao contrário deste envolve um número infinitamente menor de sequências gênicas, ainda assim comporta certa dose de imprevisibilidade. Não obstante envolver a transferência de alguns poucos genes muito bem caracterizados, não é possível prever com exatidão o sítio do genoma hospedeiro em que se dará a integração do transgene, bem como as consequências dessa inserção na expressão de outros genes. Logo, as consequências da modificação genética são avaliadas caso a caso, uma vez que cada organismo modificado deriva de um evento único de transformação.

Os principais pontos a serem considerados no processo de avaliação de segurança de alimentos geneticamente modificados, e que devem ser tomados com base no melhor conhecimento científico disponível, são: (1) o organismo objeto da modificação genética, (2) a construção genética ou transgene envolvido, (3) os produtos da expressão dos novos genes introduzidos, (4) a composição química do organismo resultante, (5) o valor nutricional e o potencial tóxico ou alergênico da nova matéria-prima alimentar.

### Organismo objeto da modificação genética

O conhecimento detalhado acerca do organismo a ser modificado é importante, pois possibilita antever eventuais pontos do desenvolvimento da nova variedade que podem merecer estudos mais aprofundados. Por exemplo, se o organismo objeto da modificação é sabidamente rico em elementos tóxicos ou antinutricionais, é importante verificar como a introdução de novos genes

poderia afetar os níveis desses compostos indesejáveis. Esse conhecimento é importante nas etapas iniciais do desenvolvimento, pois permite que projetos que poderiam levar a matérias-primas potencialmente mais perigosas sejam abortados, possibilitando significativa economia de tempo e recursos, e também na etapa final de aprovação para consumo, por parte de entidades ou órgãos regulatórios incumbidos dessa função. No caso de plantas, a caracterização deve abranger histórico de uso, cultivo, taxonomia, reprodução, composição química e toxicológica etc. Em suma, o organismo objeto da modificação genética deve ser conhecido em profundidade, de modo a subsidiar etapas posteriores da avaliação de segurança.

### **Construção genética ou transgene envolvido**

A caracterização do transgene envolvido na modificação genética implica em profundo conhecimento a respeito das sequências gênicas envolvidas na montagem da construção. Ainda que o DNA, *per se*, seja considerado seguro, uma vez que está naturalmente presente nos alimentos convencionais, é importante conhecer detalhadamente as sequências que compõem o transgene. É preciso saber a fonte ou organismo de origem dos fragmentos de DNA utilizados, as suas sequências de nucleotídeos, com identificação das regiões codificadoras, a presença de elementos regulatórios da transcrição e a eventual ocorrência de elementos de transposição.

Embora o DNA seja facilmente degradado durante o processamento ou no trato digestivo, também é importante verificar a capacidade de resistência do transgene a essas condições, pois esse pode ser um dado importante na estimativa do potencial de transferência horizontal das sequências envolvidas. A passagem de fragmentos de genes do alimento geneticamente modificado para células do trato digestivo ou para bactérias intestinais é um evento de baixa probabilidade de ocorrência e sem consequências importantes, como atesta o fato de que não nos tornamos transgênicos com o consumo de alimentos convencionais, apesar das grandes quantidades de DNA ingeridas. No entanto, uma vez que muitos genes marcadores da modificação genética são genes de resistência a antibióticos, convém assegurar a baixa resistência dessas sequências gênicas ao processamento ou à digestão a fim de garantir a segurança para o consumidor.

Estratégias mais atuais de triagem de células transformadas devem levar, num futuro bastante próximo, ao abandono do uso de genes de resistência a antibióticos, ou à sua eliminação após a etapa de seleção das células modificadas, quando deixam de cumprir qualquer finalidade nos organismos delas derivados.

### **Produtos da expressão dos novos genes introduzidos**

As proteínas resultantes da expressão dos novos genes introduzidos também merecem atenção no processo de avaliação de segurança. É preciso conhecer detalhadamente essas proteínas, tanto do ponto de vista estrutural, em relação à sua sequência primária, bem como conformação e interações, quanto em relação à sua função. As novas proteínas devem ser avaliadas quanto à função biológica desempenhada nos organismos de origem e de que maneira a sua presença poderia afetar o organismo receptor. Se apresentar função catalítica, os principais aspectos cinéticos e sua especificidade quanto a potenciais substratos utilizados devem ser conhecidos. Se a nova proteína for uma toxina, seu mecanismo de ação bem como seu espectro de ação devem ser claramente definidos.

### **Composição química do organismo resultante**

Após serem analisados os elementos diretamente resultantes da modificação genética, ou seja, as novas sequências de DNA do transgene e seus respectivos produtos de expressão, as proteínas derivadas, é preciso buscar por efeitos não intencionais na composição química do organismo geneticamente modificado. A análise química de um organismo obtido por modificação genética pode ser extremamente complexa e resultar infrutífera se forem empregados conceitos toxicológicos utilizados na avaliação de compostos químicos individuais, como pesticidas. Assim, foi estabelecido o princípio da equivalência substancial para nortear o processo de avaliação de

segurança de alimentos derivados da biotecnologia. Esse princípio preconiza uma ampla caracterização química em relação aos principais macro e micronutrientes, e aos metabólitos secundários com potencial atividade biológica, de modo a subsidiar avaliações toxicológicas posteriores mais dirigidas ou específicas. A finalidade da aplicação desse conceito é estimar o grau de similaridade da variedade geneticamente modificada em relação à variedade convencional que lhe deu origem quanto a aspectos nutricionais e toxicológicos.

É importante destacar que eventuais diferenças de composição química observadas entre a variedade geneticamente modificada e sua análoga convencional devem ser analisadas em relação à variabilidade observada na espécie em relação às condições de cultivo e entre as diferentes variedades convencionais. Pode ser que eventuais diferenças notadas entre a modificada e a parental sejam muito menores do que aquelas que se observam quando se comparam duas diferentes variedades convencionais, ou quando uma mesma variedade convencional é cultivada em regiões geográficas distintas, por exemplo.

### **Valor nutricional e o potencial tóxico ou alergênico da nova matéria-prima alimentar**

Não obstante as diferenças intencionais decorrentes da presença do transgene, o que se espera da modificação genética é que resulte numa variedade tão segura quanto a variedade convencional que lhe deu origem. Isso implica dizer que as variedades convencionais, apesar do amplo histórico de segurança, oferecem algum risco para o consumidor. Esse risco trazido pelas variedades convencionais pode ser exemplificado pela presença de toxinas, fatores antinutricionais e compostos tóxicos inerentes em muitas plantas utilizadas como alimentos e sobre as quais não pairam quaisquer dúvidas quanto à segurança para consumo humano ou animal. Portanto, o risco trazido pelo consumo de uma matéria-prima alimentar geneticamente modificada deve ser equivalente ao da sua análoga convencional, cujo risco não é zero, mas que apresenta um amplo histórico de segurança para consumo.

Embora os dados de composição química apontem significativa equivalência entre a matéria-prima convencional e a geneticamente modificada, ou as diferenças existentes serem pequenas ou não trazerem consequências negativas, pode ser necessário, às vezes, atestar o valor nutricional e a segurança dessas matérias-primas por meio de ensaios com animais de experimentação. O valor nutricional de uma matéria-prima geneticamente modificada pode ser confirmado não só pela avaliação criteriosa de sua composição química mas sobretudo pela sua eficácia em proporcionar macro e micronutrientes a animais alimentados com rações derivadas dessas matérias-primas. Se, por exemplo, filhotes de aves ou suínos forem divididos em dois grupos, sendo um deles alimentado com ração feita a partir da variedade convencional e o outro grupo alimentado com a ração derivada da matéria-prima geneticamente modificada, é possível comparar as taxas de ganho de peso durante o período, bem como incidência de doenças, manifestação de eventuais efeitos adversos, mortalidade etc.

A utilização de animais em fase de crescimento e com desenvolvimento acelerado tem a vantagem de ser um modelo extremamente sensível às diferenças nos teores de nutrientes ou à presença de eventuais fatores tóxicos ou antinutricionais. Nesse sentido, é importante destacar que a análise sistemática de estudos de longa duração e de estudos multigeracionais com animais, ou seja, envolvendo o acompanhamento de duas a cinco gerações alimentadas com rações GM, não apontou nenhum efeito nocivo para a saúde com base em parâmetros bioquímicos, hematológicos, histológicos e de incorporação de DNA. Ainda, quando foram notadas pequenas diferenças elas estiveram dentro da faixa de variação normal dos indivíduos.<sup>15</sup> De fato, a utilização de matérias-primas GM para a produção de rações para alimentação animal atesta a segurança das variedades geneticamente modificadas aprovadas para cultivo e comercialização, pois até o presente não foram observadas diferenças de desempenho no crescimento dos animais. Não obstante essas evidências de segurança para o consumo, a perspectiva de aumento de alimentos

GM de segunda geração, com alteração significativa de sua composição química, sinaliza uma demanda permanente de aprimoramento nos modelos experimentais com animais.<sup>6</sup>

### **Alergenicidade**

Com relação à alergenidade dos alimentos obtidos por transgenia, é preciso considerar tanto a presença das novas proteínas introduzidas pela modificação genética quanto a eventual mudança nos teores de proteínas alergênicas inerentes à matéria-prima convencional. Com relação às novas proteínas, é possível, ainda em fases bastante preliminares do desenvolvimento da nova variedade, comparar as suas sequências de aminoácidos e sua estrutura com aquelas de alérgenos de importância por meio de recursos de bioinformática. Qualquer similaridade que implique na reprodução de trechos com o potencial de desencadear a resposta imune (epítomos) observados em proteínas alergênicas deve ser evitado e isso pode ser suficiente para abortar o desenvolvimento de uma nova variedade.

Além disso, se a nova proteína apresentar resistência a desnaturação térmica ou ao pH, ou à digestão com pepsina ou tripsina em ensaios de simulação de fluidos gástrico e intestinal, isso pode ser suficiente para que sejam levantadas suspeitas quanto à sua segurança. No caso de a modificação genética ser feita em uma espécie sabidamente alergênica, é necessário investigar como os níveis das proteínas alergênicas foram afetados. Ainda que indivíduos diagnosticados como alérgicos a determinados alimentos devam evitá-los, independente da origem, se convencionais ou derivados da biotecnologia, é importante que a modificação genética não seja um fator que implique potencial aumento de risco para o desenvolvimento de alergia na fração saudável da população, como consequência do aumento dos teores e, portanto, dos níveis de exposição a proteínas alergênicas.

### **Rotulagem de alimentos geneticamente modificados**

A segurança de que o uso da moderna biotecnologia não causará danos à saúde humana ou ao meio ambiente implica no estabelecimento de normas adequadas de manipulação, análise de riscos de produtos biotecnológicos, assim como de mecanismos e instrumentos de monitoramento e rastreabilidade.

No Brasil, a questão da biotecnologia é regulamentada desde 1995 (Lei nº 8.974/1995), e a nova Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105/2005) autoriza o uso dessa tecnologia no país e estabelece normas de segurança e fiscalização de atividade com organismos geneticamente modificados (OGM) e derivados. Além disso, essa lei criou o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) e o Sistema de Informação de Biossegurança (SIB), bem como ratificou a criação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e suas competências.

Um aspecto importante da regulamentação de produtos biotecnológicos diz respeito à rotulagem dos alimentos. O Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003, estabelece que tanto os produtos embalados como os vendidos a granel ou *in natura* produzidos a partir de OGM, com presença acima do limite de um por cento do produto, deverão ser rotulados, e o consumidor deverá ser informado sobre a espécie doadora do gene objeto da modificação.

Diferentemente do que pode sugerir esse valor de 1% para rotulagem, isso não tem qualquer relação com a segurança dos produtos, pois uma vez que eles foram liberados para a comercialização eles são considerados seguros. Prova disso é o fato de que os limites para a rotulagem variam ao redor do mundo, havendo controles mais ou menos estritos.

Na União Europeia é preconizada a rotulagem de todos os produtos derivados de matérias-primas geneticamente modificadas. Os produtos destinados à alimentação humana ou animal devem ser rotulados caso seja ultrapassado o limite de tolerância de 0,9%. Em contraste, ovos, leite e carne de animais alimentados com essas matérias-primas não necessitam de rotulagem. No Japão existe o nível para rotulagem de 5% para a soja, mas não para o milho, enquanto na Austrália e Nova Zelândia vigora o valor de 1% acima do qual a rotulagem é obrigatória.

No caso dos EUA, não há obrigação para a rotulagem de alimentos derivados da moderna biotecnologia. Contudo, isso não significa que os produtos aprovados não tenham sido avaliados quanto à sua segurança. O fato é que a FDA considera que a rotulagem deve ser justificada pela composição e não pelo processo de obtenção do alimento. Uma vez que os alimentos geneticamente modificados são substancialmente equivalentes aos seus análogos convencionais, não se faz necessária nenhuma rotulagem. Caso tenham conteúdo nutricional muito diferente ou tenham potencial alergênico, aí sim a rotulagem seria justificada.

## Expansão do plantio e uso comercial

Desde o início do plantio comercial de culturas geneticamente modificadas nos EUA, em meados da década de 1990, a área plantada tem aumentado significativamente em todo o mundo, assim como o número de países produtores de culturas modificadas.

A soja geneticamente modificada responde pela primeira posição, seguida do milho, algodão e canola, e os principais tipos de modificação dizem respeito à resistência a herbicidas ou a insetos.

Dados de 2011 do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA) apontam o Brasil como o país com a segunda maior área dedicada ao cultivo de transgênicos, depois dos EUA, com 30,3 milhões de hectares ocupados por soja, milho e algodão geneticamente modificados.<sup>8</sup> Atualmente (2013), apenas quatro culturas, algodão, milho, soja e feijão estão liberadas para comercialização no Brasil, mas a lista de pedidos de autorização para liberação comercial torna possível vislumbrar um futuro com inúmeros produtos derivados da moderna biotecnologia. Das culturas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização no Brasil, apesar da soja ter sido a primeira e atualmente contar com o total de cinco variedades, o maior número é de milho, com 18, seguido do algodão com 12 variedades. No caso do feijão, a única variedade autorizada é um produto desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), comercialmente denominado EMBRAPA 5.1, que tem como característica a resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro.<sup>2</sup>

A diversidade de produtos comerciais geneticamente modificados deverá crescer nos próximos anos, assim como a complexidade das matérias-primas, em razão da recente tendência de combinação de mais de um transgene em um mesmo organismo. Nesse sentido, o melhoramento genético convencional pode ser combinado à transgenia para obtenção de novas variedades comerciais.

Variedades contendo vários transgenes podem ser desenvolvidas a partir do cruzamento entre variedades parentais geneticamente modificadas, resultando no “empilhamento” ou “piramidização” de genes (“*gene stack*”). Genes “piramidados” são, portanto, aqueles originados de OGM, mas combinados por meio de melhoramento genético clássico. Exemplo disso é o milho “*SmartStax™*”, desenvolvido nos EUA, que resulta do cruzamento de quatro produtos aprovados dos seguintes eventos: MON 89034 x TC1507 x MON 88017 x DAS-59122-7.<sup>8</sup> Essa variedade apresenta um total de oito transgenes diferentes (*cry2Ab*, *cry1A.105*, *cry1F*, *cry3Bb1*, *cry34*, *cry35Ab1*, *cp4*, e *bar*) que resultam na manifestação de três características, uma de tolerância a herbicidas e duas de resistência a pragas.

No Brasil, a primeira variedade com genes piramidados data de 2009, sendo um milho com resistência a insetos e tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato, obtido da combinação dos eventos BT11 e GA21, desenvolvido por cruzamento do milho com o transgene para expressar a proteína Cry1A e o milho expressando as proteínas PAT e mEPSPS.<sup>2</sup>

Além da “piramidização”, há ainda a possibilidade de obtenção de híbridos geneticamente modificados, obtidos do cruzamento de uma linhagem recombinante com uma linhagem não transgênica. Essa estratégia pode ser útil para a transferência da característica conferida pelo transgene para uma variedade convencional mais adaptada ao cultivo em determinada região. Contudo, qualquer que seja a origem da variedade geneticamente modificada, é necessária a avaliação caso a caso de sua segurança para o consumidor, de acordo com o que foi apresentado nos tópicos anteriores.