

201

Circular
Técnica

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2013

Autores

Maria José Vilaça de Vasconcelos

Farmacêutica/Bioquímica,
PhD e Pesquisadora Embrapa
Milho e Sorgo, Caixa Postal
151 35701-970 Sete
Lagoas, MG
mariajose.vasconcelos@
embrapa.br

Andréa Almeida Carneiro
Bióloga, PhD e Pesquisadora
Embrapa Milho e Sorgo,
Caixa Postal 151
35701-970 Sete Lagoas,
MG
andrea.carneiro@embrapa.
br

Metodologia de Análise de Biossegurança: Análise de Risco de Milho Geneticamente Modificado

Introdução

O milho é umas das fontes mais importantes de alimento no mundo, sendo insumo para a produção de uma grande variedade de gêneros alimentícios, rações e produtos industriais. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, com aproximadamente 70 milhões de toneladas no ano de 2011 (CONAB, 2011). O plantio do milho no Brasil é realizado basicamente em duas safras, sendo cultivado em praticamente todo o território nacional.

O cultivo de plantas transgênicas de milho e o consumo de seus derivados são eventos relativamente recentes no mundo e têm sido alvo de grande interesse pela comunidade em geral. Neste sentido, algumas questões relacionadas às plantas transgênicas devem ser consideradas, como, por exemplo, o Brasil, por ser signatário do Protocolo de Cartagena, adota o princípio de precaução de acordo com Princípio 15 da Declaração do Rio, mencionado no Artigo 1 do Protocolo de Cartagena, ratificado pelo Brasil. A abordagem de precaução deve ser utilizada nas avaliações de produtos geneticamente modificados, orientando as avaliações de biossegurança com relação a questões relevantes, que devem ser selecionadas à luz do conhecimento existente sobre o tema.

Assim sendo, a biossegurança de milhos transgênicos a serem lançados comercialmente no Brasil deve ser avaliada “caso a caso”, determinando-se as implicações do seu plantio comercial para o meio ambiente, para a saúde humana e animal e para os vários elos e atores dos sistemas de produção dessa cultura. Os milhos transgênicos já liberados ou em processo de liberação para uso comercial no Brasil estão listados na Tabela 1.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de exemplificar quais informações são normalmente requeridas como suporte para uma avaliação de biossegurança de plantas transgênicas.

Tabela 1. Milhos transgênicos liberados para uso comercial no Brasil.

Yield Gard	MON-ØØ810-6	MON810	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	Cry1Ab	Monsanto	2007
Liberty Link	ACS-ZMØØ3-2	T25	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida	PAT	Bayer	2007
TL	SYN-BTØ11-1	Bt	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicidas	Cry1Ab PAT	Syngenta	2007
Roundup Ready 2	MON-ØØ6Ø3-6	NK603	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida	CP4-EPSPS	Monsanto	2008
TG	MON-ØØØ21-9	GA21	<i>Zea mays</i>	Tolerante a Herbicida	mEPSPS	Syngenta	2008
Herculex	DAS-Ø15Ø7-1	TC1507	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1F PAT	Dow	2008
YR YieldGard/RR2	MON-ØØ6Ø3-6	NK603 & MON810	<i>Agrobacterium tumefaciens/Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	CP4-EPSPS Cry1Ab	Monsanto	2009
TL/TG	SYN-BRØ11-1	Bt11 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes/Zea Mays</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Cry1Ab PAT mEPSPS	Syngenta	2009
Viptera-MIR162	SYN-IR162-4	MIR162	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	VIP3Aa20	Syngenta	2009
HR Herculex/RR2	DAS-Ø15Ø7-1	TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes/Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a inseto e Tolerante a Herbicida	Cry1F PAT CP4-EPSPS	Du Pont	2009
Pro	MON-89Ø34	MON89034	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	Cry1A.105 Cry2Ab2	Monsanto	2009
TL TG Viptera	SYN-BTØ11-1 SYN-IR162-4 MON-ØØ21-9	Bt11 & MIR162 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes/Zea Mays</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1Ab VIP3Aa20 mEPSPS	Syngenta	2010
PRO2	MON-89Ø34-3	MON89034 7	<i>Bacillus thuringiensis/Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS	Monsanto	2010
Yield Gard VT	MON-ØØ6Ø3-6	NK603	<i>Agrobacterium tumefaciens/Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	CP4-EPSPS Cry3Bb1	Monsanto	2010
Power Core	MON-89Ø34-3	MON89034 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes/Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4-EPSPS	Monsanto e Dow	2010
PW/Dow	DAS-Ø15Ø7-1	TC1507 & NK603	<i>viridochromogenes/Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a herbicida	Agrosciences	Agrosciences	2010
HX YG RR2	MON-ØØ810-6	MON810 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes/Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	cry1Ab Cry1F PAT CP4EPSPS	Du Pont	2011
TC1507xMON810	DAS-Ø15Ø7 & MON810	TC1507 & MON810	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1F Cry1Ab PAT	Du Pont	2011
MON89034 x MON88017	MON-89Ø34-3	MON89034 & MON88017	<i>Bacillus thuringiensis/Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry3Bb1 CP4-EPSPS	Monsanto	2011

Fonte: CTNBio (2013)

Análise de Risco

Avaliação de risco é definida como sendo o processo com base científica que consiste na identificação e caracterização do perigo, da avaliação da exposição e da caracterização dos efeitos do risco. Perigo é definido como o potencial de um agente provocar efeitos nocivos. O risco está relacionado com a probabilidade de ocorrência (exposição) de um perigo definido (KUIPER et al., 2001). Basicamente, a avaliação da segurança de Plantas Geneticamente Modificadas – PGMs para a saúde humana e animal e para o meio ambiente procura determinar os riscos existentes na utilização destes produtos. Portanto, uma análise de biossegurança compreende a identificação do perigo e, se este for identificado, uma avaliação do risco e da exposição.

A biossegurança de organismos transgênicos é normalmente baseada em informações sobre o organismo receptor ou hospedeiro e sobre o gene introduzido, portanto, uma revisão de literatura detalhada sobre o assunto é de primordial importância. A OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) tem publicado documentos, conhecidos como “Consensus Documents”, utilizados pelos países membros, para auxiliar na compilação de informações sobre diversos organismos hospedeiros e características de interesse que são utilizadas nas cultivares transgênicas. Estes documentos apresentam informações sobre o organismo hospedeiro e a proteína codificada pelo gene de interesse, consideradas importantes para a análise de biossegurança. Os “Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* – Derived insect control proteins” <http://www.agbios.com/docroot/articles/07-214-001.pdf> , “Consensus document on the Biology of the *Zea mays* subsp. *mays* (maize)” [http://www.olis.oecd.org/olis/2003doc.nsf/LinkTo/NT0000426E/\\$FILE/JT00147699.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/2003doc.nsf/LinkTo/NT0000426E/$FILE/JT00147699.PDF) e

“Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites” [http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/NT00002F66/\\$FILE/JT00130429.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/NT00002F66/$FILE/JT00130429.PDF) complementam as informações deste capítulo. Estes documentos são fontes seguras de informações, entretanto, para se tornarem úteis para as análises de biossegurança estas informações gerais precisam ser complementadas com os dados regionais de cada país. Um sumário das principais informações contidas em documentos *consensus* é apresentado a seguir para o milho e para as metodologias de transformação utilizadas na produção de milho transgênico.

A Biologia do Milho (*Zea mays*)

A cultura-mãe ou cultura-hospedeira do transgene frequentemente serve como ponto de referência na avaliação da segurança da cultura geneticamente modificada (GM). O avaliador de segurança precisa ter o máximo possível de informações sobre genótipo, fenótipo, composição centesimal, antinutrientes ou substâncias biologicamente ativas, toxinas ou alérgenos alimentares, diversidade, e história de uso seguro da cultura isogênica não transgênica.

Organismo receptor: *Zea mays* L., o milho.

Características fenotípicas: *Zea mays* é um membro da família de gramíneas (Poaceae), uma espécie monoica anual variando em altura de 1-4 metros. A arquitetura da planta é definida por uma haste (colmo) com nós compactos. As inflorescências masculinas e femininas estão presentes na mesma planta, mas localizadas separadamente. A flor feminina é uma inflorescência pistilada, com as flores nascendo em uma espiga longa. Cada flor tem um estilo que se prolonga por até 45 cm de comprimento, permitindo

a sua exposição através da palha para a polinização. Flores femininas permanecem viáveis para a fecundação por até duas semanas. Na inflorescência masculina (pendão ou estaminadas) as espiguetas são dispostas aos pares no pendão, que consiste de um eixo central e geralmente várias ramificações. O pendão é perfeitamente posicionado para distribuir, pelo vento, o pólen que é produzido em grande quantidade (GOODMAN; SMITH, 1987).

O milho é uma das plantas superiores mais bem caracterizadas cientificamente, sendo hoje a espécie cultivada que atingiu o mais elevado grau de domesticação e só sobrevive na natureza quando cultivado pelo homem (BAHIA FILHO; GARCIA, 2000).

Distribuição Geográfica e Habitat Natural: O milho vem sendo domesticado pelo homem há mais de 8 mil anos e, historicamente, originou-se das regiões tropicais do México e da Guatemala e se espalhou pelas Américas (GOODMAN, 1987). Atualmente, é produzido na maioria dos países do mundo, sendo o grão mais plantado depois do trigo e do arroz. México e América Central são as únicas regiões onde linhagens ancestrais são encontradas em nossos dias.

Transferência de genes entre o milho e outros organismos: *Zea* é uma gramínea pertencente a família, Poaceae, na tribo Maydeae. A tribo Maydeae consiste de sete gêneros: *Zea*, *Tripsacum*, *Coix*, *Sclerachne*, *Polytoxa*, *Chionachne* e *Trilobachne*. *Zea* é o único gênero cultivado no Brasil, sendo composto por quatro espécies de teosintes. Teosintes são as espécies mais próximas relacionadas com o milho (*Zea mays Mexicana*) e são encontradas em regiões do México e da Guatemala. Elas podem facilmente cruzar com o milho gerando descendentes férteis. No Brasil, não foi encontrada qualquer espécie selvagem sexualmente compatível com o milho.

Reprodução e Disseminação: O milho é uma planta polinizada pelo vento, sendo a dispersão do pólen o único meio eficaz de transferência de genes entre plantas. As plantas de milho liberam o pólen por até 14 dias, o qual pode se deslocar a longas distâncias, entretanto, a maioria é depositada próxima à área de plantio. A autopolinização ocorre em aproximadamente 5% e a polinização cruzada em 95% dos grãos. O pólen de milho mede aproximadamente 0,1 mm de diâmetro, sendo os maiores grãos de pólen disseminados pelo vento. A dispersão dele é influenciada por seu tamanho e pela sua rápida taxa de sedimentação, menos de 1% do pólen chega a 60 metros da borda de um campo de milho em condições normais (PATERNIANNI; CAMPOS, 1999). O pólen é viável por cerca de 2 horas e a polinização cruzada não foi observada em distâncias maiores do que 200 metros da fonte de pólen (LUNA et al., 2001). O isolamento das culturas utilizando as distâncias de isolamento e obstruções físicas são procedimentos normais para conter o fluxo gênico e garantir a pureza das sementes na produção de sementes de milho. A distância mínima da fonte de pólen para outro campo de produção de milho varia de 200-400 m, dependendo da natureza do material genético. Além disso, o plantio dos campos com diferentes cultivares deve ser feito em períodos que geram um mínimo de 30 dias entre florações de um campo para outro. Isolamentos físicos e temporais já foram estabelecidos e são utilizados regularmente, com sucesso, para produção de sementes de milho.

As plantas de milho são anuais e sementes raramente sobrevivem de um ciclo para outro, naturalmente. Sob condições normais, o milho reproduz-se apenas pela produção de sementes. Assim, em face da natureza dos grãos, das espigas e das próprias plantas de milho, a sobrevivência desse vegetal está limitada ao ciclo de plantio e colheita efetuado pelo homem, já que é totalmente dependente deste para que as sementes germinem após

a debulha da espiga. Todas as plantas voluntárias presentes no campo após a colheita são facilmente identificadas e controladas manual, mecânica ou quimicamente. Com base nas características de plantas voluntárias descritas por Baker (1965), não há nenhuma evidência que sustente a ideia de que o milho *Bt* irá se tornar uma planta voluntária e promover a invasão de áreas não cultivadas.

Interações com outros organismos no

ambiente: O milho interage com uma grande variedade de organismos no meio ambiente, incluindo insetos, microrganismos, pássaros e mamíferos. Sendo uma espécie polinizada pelo vento, não requer a ajuda de insetos para se reproduzir, no entanto, os insetos que se alimentam de pólen podem ser afetados em campos floridos.

Insetos que se alimentam de vermes e de resíduos no solo também podem estar presentes em campos de produção de milho. Insetos predadores e parasitoides podem sobreviver alimentando-se de insetos herbívoros que se alimentam de plantas de milho. Várias aves e mamíferos alimentam-se de sementes de milho e de tecidos vegetativos e podem estar presentes nas áreas de produção de milho. Além disso, no agroecossistema de milho uma grande variedade de microrganismos pode ser encontrada no solo. Vários destes estão associados a processos envolvidos na produtividade agrícola, tais como solubilização ou mineralização e fixação de nitrogênio e fósforo (*Azotobacter*, *Beijerenckia*, *Azospirillum*, *Mycorrhizae*, etc) (VAN ELSAS; VAN OVERBEEK, 1999).

Características tóxicas, patogênicas ou prejudiciais à saúde humana ou animal:

O milho não apresenta qualquer característica tóxica, é amplamente cultivado e historicamente a sua utilização não é prejudicial. O milho contém apenas baixos níveis dos antinutrientes naturais, inibidores de tripsina e quimiotripsina. Milho ou produtos dele derivados não são

considerados de risco para a saúde humana ou animal.

Composição centesimal: Valores referenciais de composição do grão para a cultura do milho podem ser encontrados em Watson (1994).

Métodos de Transformação Genética de Milho

O método pelo qual os transgenes são introduzidos na planta hospedeira determina, em parte, os requisitos de informação para a avaliação da biologia molecular do evento transgênico.

Transformação de Milho Usando o

Bombardeamento com Micropartículas: O bombardeamento de células vegetais com DNA de interesse é um método direto de transformação desenvolvido para introduzir ácidos nucleicos no genoma ou plastoma de células (TAYLOR; FAUQUET, 2002). Na transformação via bombardeamento de partículas ou biobalística, micropartículas de metal cobertas com o gene de interesse são aceleradas em direção às células-alvo, utilizando-se equipamentos conhecidos como "gen gun" ou canhão gênico (SANFORD, 1988), com velocidades suficientes para penetrar a parede celular e não causar a morte da célula. DNA precipitado sobre as micropartículas é liberado gradualmente dentro da célula pós-bombardeamento, e integrado ao genoma (KLEIN et al., 1987).

As principais vantagens do bombardeamento estão relacionadas com a utilização de vetores simples e de fácil manipulação, além da possibilidade da inserção de mais de um gene de interesse nas células de maneira eficiente. Embora seja considerado um método de transformação bastante eficiente para o milho uma possível desvantagem é a ocorrência de múltiplas cópias do GDI e de complexos padrões de integração susceptível

ao silenciamento da expressão gênica nas gerações futuras (WANG; FRAME, 2004).

Transformação de Milho Mediada por *Agrobacterium*: *Agrobacterium* é uma bactéria de solo capaz de causar tumores vegetais na região da infecção. Estes tumores resultam da transferência do plasmídeo Ti da célula bacteriana para a célula vegetal (GELVIN, 2003).

Agrobacterium tumefaciens constitui um excelente sistema de introdução de genes em células vegetais uma vez que: (i) o DNA pode ser introduzido em todos os tecidos da planta; (ii) a integração do T-DNA é um processo relativamente preciso. Um problema identificado nas transformações mediadas por *Agrobacterium* é a presença, em alguns eventos, de sequências do vetor localizadas fora das extremidades direita e esquerda (KONONOV et al., 1997). Para o milho, a técnica de *Agrobacterium* relatada resultou em alta eficiência com alto número de eventos contendo apenas uma ou um baixo número de cópias do transgene no genoma quando comparada com a biobalística (ISHIDA et al., 1996).

Análises Moleculares

A caracterização molecular de uma planta transgênica é usada para fornecer informações sobre a composição e integridade do DNA inserido, o número de cópias do DNA inserido, o número de sítios de inserção e o nível de expressão da nova proteína ao longo do tempo e em diferentes tecidos. O sítio da integração no genoma do hospedeiro, no caso das plantas transgênicas, pode fornecer informações sobre as possíveis consequências diretas e indiretas da modificação genética.

Uma planta transgênica, além do gene de interesse, recebe sequências regulatórias, tais como promotores, terminadores, e muitas vezes de genes marcadores e outros elementos

úteis para o desenvolvimento do processo. Tais componentes são frequentemente provenientes de diferentes espécies. Assim, a caracterização molecular do transgene após a inserção na planta é um importante componente da análise de risco (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004). Todos os pareceres técnicos para a liberação comercial de milho transgênico para comercialização no Brasil descrevem quais foram as análises utilizadas para a caracterização molecular dos eventos em estudo e os resultados obtidos.

Análise de Risco Alimentar

A avaliação da segurança alimentar de alimentos derivados de matérias-primas geneticamente modificadas é baseada na análise de risco, a qual é balizada pelo conceito de equivalência substancial. Para determinação da equivalência substancial, a composição do organismo geneticamente modificado (OGM) deverá ser comparada com a composição de seu análogo convencional, preferencialmente a linhagem parental direta sob condições ambientais similares, minimizando diferenças na composição não relacionadas à composição genética. Ao mesmo tempo, é necessário avaliar a nova variedade geneticamente modificada em diferentes locais (diferentes condições ambientais) e durante temporadas subsequentes (diferentes condições de clima), com a finalidade de verificar se não houve alteração de rotas metabólicas, com possíveis efeitos adversos na composição da planta (KUIPER et al., 2001).

Quando a transformação genética não tem como objetivo principal a mudança da constituição nutricional da variedade parental, as análises de biossegurança alimentar são baseadas nos métodos tradicionais aplicados para a avaliação dos constituintes de um alimento, tais como proteína total, gorduras, cinzas, fibras, micronutrientes, perfil aminoacídico, perfil de ácidos graxos, carboidratos, compostos inorgânicos e

antinutrientes. Grãos dos eventos transgênicos foram produzidos em dois anos consecutivos nos Estados Unidos e na Europa em diferentes condições de campo e foram comparados com a linhagem-controle, de pedigree semelhante, não transgênica, utilizando métodos de análise validados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) quanto ao conteúdo de umidade, proteína, gordura, cinza, calorias, carboidratos, fibra. Os resultados obtidos estavam dentro das faixas descritas na literatura e mostraram uma equivalência entre o transgênico e o controle não transgênico (CENTER FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, 2010). Do ponto de vista nutricional, a composição dos aminoácidos metionina, cistina, lisina, triptofano, isoleucina, histidina, valina, leucina, arginina, fenilalanina, glicina, alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, prolina, serina e tirosina foi comparável à do controle e a valores descritos na literatura. Similarmente, o perfil dos ácidos graxos linoleico, oleico, palmítico, esteárico e linolênico foi análogo aos dados de literatura. Dosagens de cálcio e fósforo foram paralelas entre o evento transgênico e a variedade controle. A análise da constituição de carboidratos do grão (amido, fibras cruas, frutose, glicose, sacarose e ácido fítico) também foi realizada.

As análises de composição centesimal dos grãos produzidos em relação à variedade convencional ou as diferenças devem estar dentro da variabilidade normalmente observada em plantas, portanto, a análise nutricional visa garantir que as novas variedades transgênicas são tão nutritivas e seguras quanto seu equivalente convencional.

Toxicidade e Alergenicidade

A proteína expressa é o principal foco dos estudos toxicológicos e alergênicos de alimentos derivados de plantas geneticamente modificadas. Neste sentido, é necessário que dados de expressão, gerados na etapa

de caracterização molecular do evento transgênico, informem em que níveis e em quais tecidos a proteína heteróloga será expressa. É indispensável ter o conhecimento se a nova proteína será produzida principalmente em partes comestíveis da planta e se o processamento do alimento resultará na sua desnaturação.

A semelhança de novas proteínas com compostos alergênicos e/ou tóxicos deve ser avaliada "in silico" por comparação da sua sequência com sequências de proteínas alergênicas e tóxicas presentes em bancos de dados tais como PIR, EMBL, SwissProt e GenBank. Esta comparação baseia-se no fato que o compartilhamento de regiões homólogas de sequências de aminoácidos entre proteínas pode oferecer subsídios para definir a atividade biológica da proteína.

As proteínas normalmente são comparadas com bancos de dados e para verificar semelhanças com compostos alergênicos; normalmente não se observa homologia biológica significativa entre sua sequência e a de toxinas presentes nas bases de dados atuais.

Um método utilizado para prever o potencial tóxico e/ou alergênico de uma proteína é o seu comportamento em fluidos digestivos. Normalmente, proteínas com características tóxicas ou alergênicas são estáveis à degradação enzimática nestes meios. Para as avaliações de biossegurança, as endotoxinas presentes nos produtos comerciais devem ser testadas para degradação ácida e enzimática. A degradação pode ser seguida por meio do desaparecimento da banda proteica em gel de SDS-PAGE. As toxinas estudadas devem ser inativadas nos estudos de digestibilidade (OECD, 2007).

O potencial tóxico e/ou alergênico da proteína deve ser conduzido usando vários critérios, incluindo homologia da sequência de

aminoácidos com alergênicos conhecidos nos bancos de dados de domínio público (Genpept, Swissprot, PIR protein), alimentação por via oral aguda em ratos, além dos ensaios de digestibilidade. Se nenhuma homologia com proteínas alergênicas presentes nos bancos de dados e nenhum efeitos nocivos utilizando concentrações de proteína superiores a 2.000 mg/kg de peso corpóreo forem detectados, a proteína é considerada de baixa toxicidade. Testes de segurança nutricional e toxicológica para todos os eventos transgênicos devem ter comprovada a inocuidade das proteínas expressas (CTNBio, 2013).

Análises de Risco Ambiental

O objetivo de uma avaliação de risco ambiental para variedades geneticamente modificadas é identificar e avaliar os riscos associados com a liberação e o cultivo destas plantas em comparação com a convencional com uma história segura de uso. As principais preocupações da análise de risco ambiental estão relacionadas (i) com o fluxo de genes tanto para organismos relacionados (transferência vertical) como para os não relacionados (transferência horizontal de genes/HGT); (ii) com o potencial do evento transgênico tornar-se uma planta voluntária, e (iii) com os efeitos secundários que possam prejudicar organismos não alvo.

Fluxo de Genes

O fluxo gênico no milho pode ocorrer por meio da dispersão de semente ou de pólen. Por ser uma espécie de fecundação cruzada, esse fluxo sempre ocorreu e continuará a ocorrer entre as variedades cultivadas pelo homem independentemente de serem crioulas ou melhoradas por cruzamento convencional ou por engenharia genética. Entretanto, existem mecanismos para a mitigação desse problema, pois métodos de controle da polinização cruzada em milho, em campos isolados, já são conhecidos desde o início do século

passado, quando se iniciou a produção de milho híbrido. Além disso, o gene ou alelo transferido só permanecerá na população se o fluxo gênico for contínuo, com uma frequência relativamente alta e se houver alguma vantagem adaptativa. As características introduzidas nos eventos de milho transgênicos liberados no Brasil não trariam consequências potencialmente danosas à saúde humana, animal ou ao meio ambiente, tendo em vista as considerações feitas anteriormente e o histórico de uso seguro em outros países há mais de 10 anos (BROOKES; BARFOOT, 2006). Em adição, não foi detectada nenhuma diferença entre o pólen de milhos transgênicos e o pólen de milhos não transgênicos que fizesse os eventos transgênicos serem mais competitivos ou eficientes na fertilização do que o pólen convencional (Parecer Técnico 1255/2008 – CTNBio 2010).

Transferência horizontal de genes (THG) é definida como a transferência de material genético de um organismo doador para outro organismo receptor que não sejam sexualmente compatíveis (GAY, 2001). A possibilidade da ocorrência de uma THG entre plantas transgênicas e microrganismos do meio ambiente é um fato real, ainda que demonstrado apenas em condições artificiais e otimizado em laboratório (BERTOLLA; SIMONET, 1999).

Entretanto, de acordo com a literatura científica consultada, fica claro que este é um evento que ocorre com uma frequência extremamente baixa (BERTOLLA; SIMONET, 1999). No meio ambiente existem inúmeras barreiras biológicas e físicas que devem ser transpostas para permitir que DNA seja transferido entre organismos filogeneticamente distantes. E, finalmente, quando uma transferência ocorre, é improvável que ela confira alguma vantagem seletiva para o microrganismo recipiente, a menos que ele esteja exposto a uma pressão de seleção. Se a transferência entre organismos geneticamente

distantes não fosse um evento extremamente raro de ocorrer, nós poderíamos regularmente encontrar exemplos de genes de plantas presentes no genoma de bactérias. Esse caso ainda não foi demonstrado nem mesmo com o sequenciamento de diferentes genomas de microrganismos.

Efeitos Secundários e Organismos Não Alvos

A análise de risco ambiental deve considerar as consequências não intencionais do plantio de uma cultura transgênica no ambiente, principalmente porque isto pode impactar o agroecossistema. No caso de plantas pesticidas, deve-se avaliar o perigo potencial para os insetos benéficos, os animais selvagens terrestres, aquáticos e plantas que possam ter uma interação direta com o evento em estudo. Caso sejam observados efeitos negativos em estudos de laboratório, estudos de campo são requeridos para acessar a probabilidade de exposição da espécie não alvo às condições de perigo detectadas (CENTER FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, 2010).

As análises de risco ambiental de plantas geneticamente modificadas iniciam-se com a identificação das funções ecológicas e espécies importantes nos sistemas de produção e ambientes naturais que poderiam ser afetadas pela introdução do evento transgênico. A escolha dos organismos não alvo é baseada no potencial de exposição no campo desta espécie à nova proteína. Para certas culturas, o EPA requer dados sobre toxicidade para mamíferos, pássaros, peixes, abelhas e outros insetos benéficos e invertebrados do solo (OECD, 2007).

Os mamíferos mais utilizados em testes de laboratório são os ratos e os camundongos e, segundo o levantamento da OECD (2007), os dados disponibilizados das pesquisas não indicam a existência de efeitos adversos

sobre estes mamíferos como previamente mencionado (BRODERICK et al., 2006).

Normalmente as aves utilizadas nos estudos toxicológicos são as codornas, os patos e frangos de corte. Com relação à utilização comercial de alguns eventos de milho transgênico, resultados negativos de testes de exposição alimentar agudos e subcrônicos utilizando codornas foram disponibilizados por várias empresas do ramo de transgênicos para plantas expressando toxinas *Bt* (revisado por OCDEC, 2007). No caso específico de milho transgênico *Bt*, testes utilizando animais aquáticos são relevantes apenas para campos cultivados nas proximidades de cursos de água. Recomenda-se utilizar peixes presentes na região de plantio do evento transgênico, dos quais se tenham informações disponíveis sobre hábitos alimentares, ecologia da espécie, manejo, distribuição geográfica e a existência de técnicas de manipulação em laboratórios já validadas.

Um dos invertebrados indicados para estudos toxicológicos é a daphnia. Este invertebrado além de apresentar o efeito de bioconcentração de substâncias tem um ciclo de vida curto e pode também ser utilizado para estudos reprodutivos. Resultados de testes apresentados por empresas detentoras de eventos OGM usando pólen proveniente de plantas transgênicas não mostraram nenhum efeito negativo em daphnia (revisado por OECD, 2007).

No caso de análise de biossegurança de milho *Bt* os insetos são os principais alvos das toxinas e, portanto, os principais organismos não alvo que precisam ser considerados na avaliação de risco destes eventos. Devido ao modo seletivo de ação, as proteínas Cry afetam vários lepidópteros e/ou insetos dípteros e têm pouca ou nenhuma toxicidade para as espécies não alvo, como, por exemplo, neurópteros, himenópteros e coleópteros. Corroborando com estas informações, o

documento consenso produzido pela OECD (2007) traz resultados de vários testes feitos com insetos indicadores, pertencentes a diferentes ordens, para as toxinas *Bt* usadas em plantas comerciais.

Testes toxicológicos em inseto não alvo, segundo as indicações do EPA, devem ser realizados em um número representativo de insetos benéficos de diferentes taxa. É recomendado que os testes sejam realizados em espécies polinizadoras, como as abelhas, e em três outras espécies de insetos, com representante de pelo menos dois dos seguintes grupos – dípteros parasitas, hemípteros predadores, coleópteros predadores, ácaros predadores, neuropteros predadores, hymenopteras parasitas.

Para avaliar o potencial tóxico de plantas-pesticidas para organismos presentes no solo normalmente são utilizados em testes a *Collembola*, por ser um organismo envolvido em degradação de detritos, e minhocas, baseando-se na possibilidade de uma exposição prolongada destes organismos a resíduos de culturas *Bt* incorporados ou deixados na superfície do solo. Segundo revisão dos resultados dos testes submetidos para aprovação comercial feita pela OECD (2007), não foram observados efeitos negativos em testes de exposição de minhocas às endotoxinas presentes em plantas comerciais. Em uma revisão sobre os efeitos das proteínas Cry sobre os organismos presentes no solo, Icoz e Stotzky (2008) apresentaram dados indicando que, em geral, pouco ou nenhum efeito tóxico de proteínas Cry tem sido relatado em artrópodes, colembolas, ácaros, minhocas, nematoides, protozoários, e nem sobre a atividade de várias enzimas presentes no solo.

Durante a avaliação de biossegurança de organismos não alvo, inicialmente altas doses das endotoxinas são testadas em laboratórios; se efeitos adversos forem observados é necessário realizar uma avaliação de risco

levando em consideração as probabilidades de exposição da espécie à toxina em campo. Várias rotas de exposição existem e dependem da ecologia, do habitat, dos hábitos alimentares e das fases de vida da espécie em estudo. A exposição pode ser direta, através da absorção da toxina presente em eventos, se agregada ao solo, ou indireta, através da cadeia alimentar entre os diversos níveis tróficos (CENTER FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, 2010).

Impacto Sobre a Microbiota do Solo

O milho transgênico tem sido explorado pelas diferentes vantagens que apresenta aos sistemas produtivos de grãos. Por outro lado, pode acarretar efeitos ecológicos adversos à microbiota do solo e a organismos da rizosfera (composição ou funções ambientais) por meio da introdução da toxina nesses ambientes por resíduos da cultura exsudados da raiz e inclusive pólen (SAXENA; STOTZKY, 2000). Estudos em laboratório detectaram a exsudação da toxina *Bt* pela raiz do milho transgênico (SAXENA; STOTZKY, 2000), trazendo questionamento sobre as possíveis interações dos exsudados da raiz com a biota de solo (rizosfera).

Alterações na composição das populações da biota do solo resultam em alterações nos processos de decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes, o que tem sido frequentemente associadas à perda de sustentabilidade (O'DONNELL; GÖRRES, 1999).

Muitas vezes é difícil determinar a composição das comunidades microbianas no solo e a sua resposta a perturbações deste ecossistema. Apesar de recentes avanços metodológicos, especialmente técnicas de biologia molecular, estarem ajudando a compreender as comunidades de microrganismos presentes nos solos, muitos aspectos ainda não são suficientemente entendidos. A maioria dos

estudos relacionados com os efeitos das culturas *Bt* no solo tem mostrado pouco ou nenhum efeito prejudicial (ICOZ; STOTZKY, 2008). Em geral, as diferenças encontradas na estrutura das comunidades microbianas são transitórias e não diretamente relacionadas com a presença das plantas transgênicas. Trabalhos publicados na literatura científica concluíram que a presença das plantas transgênicas não afeta de forma significativa a microbiota e os animais que vivem no solo (MUCHAONYERWA et al., 2004; ICOZ; STOTZKY, 2008).

Conclusões

Os eventos de milho transgênicos liberados para comercialização têm gerado benefícios significativos desde sua introdução em meados dos anos 90. Inúmeras autoridades reguladoras ao redor do mundo avaliaram os dados científicos sobre milho transgênicos, e concluíram que estes produtos são seguros e adequados para a introdução na agricultura comercial. Essas afirmações podem ser ratificadas por quase 20 anos de história de uso seguro dos transgênicos em todo o mundo.

Referências

- BAHIA FILHO, A. F. C.; GARCIA, J. C. Análise e avaliação do mercado brasileiro de sementes de milho. In: UDRY, C. V.; DUARTE, W. F. (Org.). **Uma história brasileira do milho: o valor de recursos genéticos**. Brasília: Paralelo 15, 2000. p. 167-172.
- BAKER, H. G. Characteristics and modes of origin of weeds. In: BAKER, H. G.; STEBBINS, G. L. (Ed.). **The genetics of colonizing species**. New York: Academic Press, 1965. p. 147-168.
- BERTOLLA, F.; SIMONET, T. P. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. **Research in Microbiology**, Paris, v. 150, p. 375-384, 1999.
- BRODERICK, N.; RAFFA, F. K.; HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 15196-15199, 2006.
- BROOKES, G.; BARFOOT, P. Global impact of biotech crops: socio-economic and environmental effects in the first ten years of commercial use. **AgBioForum**, v. 9, p. 139-151, 2006.
- CENTER FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT - CERA. Disponível em: <http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_data_base&mode=ShowProd&data=MON810>. Acesso em: 05 abr. 2010.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Milho total: 1ª e 2ª safra: Brasil: série histórica de área plantada: safra 1976-77 a 2006-09**. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/MilhoTotalSerieHist.xls.m>>. Acesso em: 26 mar. 2013.
- CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 675-689, 1992.
- CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br>>. Acesso em: 18 mar. 2013.
- DE BLOCK, M.; DE BROWER, D.; TENNING, P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the

transgenic plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 91, p. 694-701, 1989.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed**. Parma, 2004. 100 p.

ESTRUCH J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 28, n. 93, p. 5389-5394, 1996.

GAY, P. The biosafety of antibiotic resistance markers in plant transformation and the dissemination of genes through horizontal gene flow. In: CUSTERS, R. (Ed.). **Safety of genetically engineered crops**. Zwwijnaarde, Belgium: Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, 2001. p. 135-159. Disponível em: <<http://www.vib.be/downloads/bioveiligheidseducatie/report.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2013.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GOODMAN, M. M. História e origem do milho. In: PARENIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 3-24.

GOODMAN, M. M.; SMITH, J. S. C. Botânica. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 1.

ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 6, p. 745-750, 1996.

ICOZ, I.; STOTZKY, G. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 559-586, 2008.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, n. 6117, p. 70-73, 1987.

KONONOV, M.; BASSUNER, B.; GELVIN, S. Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. **Plant Journal**, v. 11, p. 945-957, 1997.

KUIPER, H. A.; KLETER, G. A.; NOTEBORN, H. P. J. M.; KOKI, E. J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **Plant Journal**, Oxford, v. 27, p. 503-528, 2001.

LUNA, S. V.; FIGUEROA, J. M.; BALTAZAR, M. B.; GOMEZ, L. R.; TOWNSEND, R. E.; SCHOPER, J. B. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1551-1557, 2001.

MUCHAONYERWA, P.; WALADDE, S.; NYAMUGAFATA, P.; MPEPEREKI, S. E.; RISTORI, G. G. Persistence and impact on microorganisms of *Bacillus thuringiensis* proteins in some Zimbabwean soils. **Plant and Soil**, v. 266, p. 41-46, 2004.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N. H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S

promoter. **Nature**, London, v. 313, p. 810-812, 1985.

O'DONNELL, A. G.; GORRES, H. 16S rDNA methods in soil microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 10, p. 225- 229, 1999.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. **Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*: derived insect control proteins**. Paris, 2007. (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, n. 42). Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/reg-biotech.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2013.

PATERNIANNI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 429-486.

SANFORD, J. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, n. 12, p. 299-302, 1988.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v. 33, n. 1, p. 35-39, 2000.

SHIMADA, N.; MIYAMOTO, K.; KANDA, K.; MURATA, H. *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ab toxin does not affect the membrane integrity of the mammalian intestinal epithelial

cells: an *in vitro* study. **Vitro Cell Development Biology Animal**, v. 42, p. 45-49, 2006.

STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 266, p. 77-89, 2004.

TAYLOR, N. J.; FAUQUET, C. M. Particle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 21, p. 963-977, 2002.

VAN ELSAS, J. D.; VAN OVERBEEK, L. S. Enhancement of the application of genetically modified *Pseudomonas* in crop protection by using environmental triggering of specific gene expression. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, R. L. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Soil fertility, soil biology, and plant nutrition interrelationships**. Lavras: SBCS: UFLA, 1999. p. 449-466.

WANG, K.; FRAME, B. Maize transformation. In: CURTIS, I. S. (Ed.). **Transgenic crops of world: essential protocols**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 45-62.

WATSON, S. A. Structure and composition. In: WATSON, S. A.; RAMSTAD, P. E. (Ed.). **Corn chemistry and technology**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1994.

Circular Técnica, 201

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: cnpms.sac@embrapa.br
1ª edição
 1ª impressão (2013): on line

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Presidente: Sidney Netto Parentoni.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Expediente

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.