

JANAÍNA GUIMARÃES VENZKE

**SEGURANÇA ALIMENTAR DE MILHO
GENETICAMENTE MODIFICADO CONTENDO O GENE
cry1Ab DE *Bacillus thuringiensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biossegurança de Alimentos).

Orientador: Leonor Almeida de Souza Soares

Pelotas, 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leonor A. de Souza Soares (Orientador), Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Eliana Badiale Furlong, Fundação Universidade de Rio Grande.

Prof. Dr. Ana Lúcia Chaves, Universidade Federal de Pelotas.

Todo impulso é cego, exceto quando há saber;
todo saber é vão, exceto quando há trabalho;
e todo trabalho é vazio, exceto quando
há amor.

KHALIL GIBRAN

Ao meu marido
A minha filha
Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Professora Leonor Almeida de Souza Soares pelo exemplo de doação. Sua experiência e sabedoria contagiam a todos que de alguma forma desfrutam de sua companhia. Agradeço, especialmente por me receber como orientada e dedicar-se plenamente na conclusão do projeto.

Ao meu marido, Denir. Grande incentivador, exemplo de paciência e dedicação, que não mediu esforços para a conclusão dessa etapa.

À minha filhota, Fernandinha, companheira e compreensiva. Tirou de letra as nossas idas e vindas. Obrigada meu amor!

Aos meus pais Paulo e Marisa, agradeço pelo incentivo, acolhida e auxílio.

À Andréa Ramos Rocha, que merece um agradecimento muito especial, já que esteve presente, e se dedicou intensamente a este projeto, pela amizade de todos estes dias, e os bons momentos compartilhados.

Ao Prof. Milton Amado e toda sua equipe do Biotério Central, pela atenção, cuidado, e conhecimento compartilhado no trato com os animais. Vocês são ótimos!

À Prof^a. Rosane Feijó e minha irmã Jamila, que contribuíram com seus conhecimentos em parte da execução do projeto.

Ao Vinícius Tabeleão pela disponibilidade e colaboração nas análises estatísticas.

À Prof^a. Cristina G. Fernandes e Márcia Dias Feltrin, do Departamento de Patologia animal da Faculdade de Veterinária pelas análises histopatológicas,

Às estagiárias Caroline, Denise, Anelise e Raquel, pela dedicação ao projeto e ao cuidado carinhosos com os camundongos.

Às amigas Roberta, Marina, Anna Lia, Emília, Alegani, Suselaine, Natália, Flávia, pela amizade, carinho, incentivo e auxílio em todos os momentos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Centro de Biotecnologia pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

VENZKE, Janaína Guimarães. **Segurança alimentar de milho geneticamente modificado contendo gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis***, 2006. 65f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O desenvolvimento rápido e crescente dos produtos biotecnológicos pode contribuir para o melhoramento genético de plantas, visando a obtenção de características agrônômicas, qualidade nutricional ou na produção de vacinas e enzimas de uso industrial. Características bioinseticidas estão sendo introduzidas em plantas como milho, algodão, soja e arroz. O uso destes produtos é alvo de críticas por que seus efeitos não podem ser previstos em sua totalidade. Estudos abordam a equivalência substancial para determinar a segurança alimentar do produto geneticamente modificado, porém compara apenas a composição química do transgênico com o análogo convencional. O recomendado é que sejam realizados testes biológicos, toxicológicos e imunológicos que caracterizam a relação dose-resposta. Para tanto, avaliações de toxicidade subcrônica do milho Bt em que foram inseridos o gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*, e a proteína Cry1Ab (comercialmente usada na pulverização de plantações de milho) foram testados em camundongos da linhagem BALB/c. As dietas contendo 10% e 30% de milho Bt e 10% de proteína Cry1Ab a dieta foram preparadas de acordo com as recomendações para roedores e comparada a dieta controle com milho convencional não geneticamente modificado. As variáveis respostas avaliadas foram ganho de peso, eficácia alimentar, dados hematológicos, dosagens bioquímicas, avaliações histopatológica e de comportamento animal. O grupo alimentado com milho Bt apresentou ganho de peso maior que o grupo controle, porém a eficácia alimentar não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Os resultados bioquímicos e histopatológicos indicam lesão hepática nos camundongos alimentados com a dieta contendo 10% e 30% de milho transgênico e proteína Cry quando comparados com o grupo controle.

Palavras chave: milho Bt, proteína Cry1Ab, segurança alimentar, transgênicos

ABSTRACT

VENZKE, Janaína Guimarães. Food safety of genetically modified corn containing gene *cry1Ab* of *Bacillus thuringiensis*, 2006. 65f. Dissertação (Mestre) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The fast and growing development of biotechnological products may contribute to the genetic improvement, aiming at agronomic characteristics, nutritional quality or on the production of vaccines and enzymes of industrial use. Bioinsecticide characteristics are being introduced in plants like corn, cotton, soy bean and rice. The use of these products has been suffering criticisms because its effects cannot be totally predicted. Studies approach the substantial equivalence to determinate the food safety of the genetically modified product, but they only compare the chemical composition of the transgenic with its conventional analogous. Biological, toxicological and immunological tests that characterize the assurance relation are recommended. For that, evaluations of subchronic toxicity of the Bt corn with the *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* and the Cry1Ab protein (commercially used for spraying the corn crops) were tested in BALB/c lineage mice. The diets were enhanced with 10% and 30% of Bt corn and 10% of Cry1Ab protein, and compared with the control diet produced with the analogous corn. The evaluated parameters were: weight gain, feeding conversion, hematological data, biochemical doses, histo-pathological evaluation and animal behavior. The group fed with Bt corn has presented higher gain weight than the control group, however the feeding conversion did not present statistic difference. The biochemical and histo-pathological results indicate hepatic injuries in the mice fed with the 10% - 30% transgenic corn plus Cry protein diet, when compared to the control group.

Keywords: Bt corn, Cry1Ab protein, food safety, transgenic.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO GERAL	9
ARTIGO 1:” O milho geneticamente modificado e a segurança alimentar”	11
RESUMO	12
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	14
A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS	16
GENES DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> UTILIZADOS EM TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS	16
O GENE CRY1Ab INSERIDO NO MILHO TRANSGÊNICO	19
A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO MILHO TRANSGÊNICO E DO MILHO ISOGÊNICO	20
SEGURANÇA ALIMENTAR	22
NORMAS DE SEGURANÇA: INSTRUÇÃO NORMATIVA CTNBIO nº 20, DE 11.12.2001	22
RECOMENDAÇÕES DA FAO/OMS	23
A EQUIVALÊNCIA SUBSTANCIAL	26
ENSAIOS DE TOXICIDADE ORAL	26
CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
ARTIGO 2: “Resposta subcrônica ao consumo de milho transgênico e da proteína Cry1Ab adicionados à dieta de camundongos”	35
RESUMO	36
ABSTRACT	36
1.INTRODUÇÃO	38
2 - MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 - ORIGEM DO MATERIAL	40
2.2 – ANIMAIS	40
2.3 - PREPARO DAS DIETAS	40
2.4 - ENSAIO BIOLÓGICO	41
2.5 - PESAGEM DOS ANIMAIS	41
2.6 - CONSUMO ALIMENTAR E CONSUMO DE ÁGUA	42
2.7 - OBSERVAÇÃO DO COMPORTAMENTO ANIMAL	42
2.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 - COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS DIETAS AVALIADAS	43
3.2 – RESPOSTA DO CONSUMO, GANHO DE PESO E EFICÁCIA ALIMENTAR ENTRE OS TRATAMENTOS	43
3.3 – INFLUÊNCIA DO COMPORTAMENTO NO GANHO DE PESO DO ANIMAL	44

4- CONCLUSÃO	46
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ARTIGO 3: “Avaliação hematológica, bioquímica e histopatológica do efeito do milho geneticamente modificado e da proteína cry1Ab na dieta de camundongos	49
RESUMO	50
ABSTRACT	50
1.INTRODUÇÃO	52
2 - MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 - ORIGEM DO MATERIAL	53
2.2 – ANIMAIS	54
2.3 - PREPARO DAS DIETAS	54
2.4- ENSAIO BIOLÓGICO	55
2.5 - COLETA DE SANGUE PARA ANÁLISES HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA.....	56
2.6 - COLETA DA URINA E ANÁLISE	56
2.7 – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	56
2.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1 - COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS DIETAS AVALIADAS	57
3.2 - ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	58
3.3 - ANÁLISE DA URINA	60
3.4 - CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	60
3.4.1. Alterações histopatológicas.....	60
3.4.2 Relação do peso do fígado com o peso animal	63
4- CONCLUSÃO	64
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CONCLUSÕES GERAIS	67
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	68

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização da tecnologia do DNA recombinante constitui uma nova e fundamental ferramenta para o contínuo desenvolvimento de sistemas agrícolas e produção de alimentos. O cultivo de produtos que utilizam esta tecnologia tem provocado opiniões diversas e contraditórias. “Talvez em nenhum outro momento o mundo científico tenha assistido tantas controvérsias, como as que estão ocorrendo na atualidade sobre a manipulação de genes” (CAVALLI, 2001). Hoffmann (1999) aponta que a ciência jamais foi questionada de forma tão impetuosa ao desvelar os resultados de seus estudos e investigações até o surgimento dos produtos geneticamente modificados.

Alguns pesquisadores garantem o consumo de produtos geneticamente modificados baseado na equivalência substancial (ES). Porém, a ES tem sido alvo de críticas pela falta de critérios mais rigorosos, pois valida o princípio de que alimentos transgênicos são iguais aos convencionais, dispensando a análise de risco (NODARI & GUERRA, 2000). Nos Estados Unidos, é utilizada esta abordagem para os alimentos transgênicos. Este princípio é considerado útil para a indústria, mas inaceitável do ponto de vista do consumidor e da saúde pública.

A defesa da existência de testes biológicos, toxicológicos e imunológicos ao invés de considerar meramente a equivalência substancial, tem como objetivo garantir a verificação da inexistência de toxinas prejudiciais, carcinogênicas e mutagênicas (NODARI & GUERRA, 2000).

“É necessário que todos os produtos transgênicos sejam examinados, avaliados e julgados, caso a caso, tendo em vista a sua finalidade benéfica e que, em concordância com a legislação e baseados nos preceitos éticos, morais, sócio-econômicos e segurança ambiental, venham garantir vantagens ao consumidor e ao processo produtivo, sem que, no entanto, se ponha em risco à vida e sua evolução como processo dinâmico e multivariável”. (Binsfeld, 2000).

Resultados de estudo de segurança alimentar realizado por 90 dias, têm sido apresentados e discutidos para fornecer evidências confirmatórias de uso seguro de

transgênicos para o consumo humano (HAMMOND et al, 2004). Tais estudos ainda são poucos, nem mesmo nos Estados Unidos, que reconhecendo o fato, manifestaram a necessidade de fazê-los (NODARI & GUERRA, 2003). A British Medical Association (1999), considerando a possibilidade de eventuais efeitos adversos das plantas transgênicas serem irreversíveis, sugeriram o banimento dos genes de resistência a antibióticos, a moratória de plantações comerciais e a melhoria da Vigilância Sanitária.

É importante que as questões relativas aos geneticamente modificados, seja discutida mais tecnicamente e divulgada de forma direta para a população (SOUZA, 1999). A garantia do consumo seguro é de responsabilidade dos órgãos que a liberam para a comercialização. O consumidor deve decidir se irá utilizar produtos oriundos ou não da biotecnologia e o setor privado deve ter liberdade na tomada de decisões estratégicas (NEVES et al, 2000). A verdade atual é a falta de dados científicos que possam permitir uma avaliação conclusiva para esta liberação.

Considerando a importância do assunto, este estudo procura abordar alguns dos aspectos mais relevantes sobre o tema, com ênfase no princípio da precaução que deve ser aplicado para prever e preparar a liberação de organismos geneticamente modificados e seus produtos na cadeia alimentar. Avaliar a segurança alimentar do gene cry1Ab presente em milho, através de toxicidade subcrônica, de 90 dias, quando presente em dieta alimentar de camundongos.

ARTIGO 1

“O MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO E A SEGURANÇA ALIMENTAR”

Revisão bibliográfica em forma de artigo, conforme as normas de Brazilian Journal of Nutrition, Campinas, SP.

O MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO E A SEGURANÇA ALIMENTAR

Janaína Guimarães Venzke¹, Andréa Ramos Rocha¹, Leonor Almeida de Souza Soares².

¹Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas/RS. Campus Universitário, s/nº, Caixa Postal, 234, Pelotas/RS, Brasil. E-mail: Janaina_venzke@ufpel.edu.br

²Biotério Central, UFPEL e Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – Fundação Universidade Federal do Rio Grande/RS, Brasil. E-mail: lassoares@brturbo.com.br

RESUMO: Com a rapidez que a biotecnologia vem desenvolvendo novas plantas transgênicas e a dificuldade que se tem em garantir que o produto desta tecnologia não traga riscos à saúde humana, uma abordagem alternativa se fez necessária para a avaliação de segurança de alimentos geneticamente modificados, que é direcionada pelo estabelecimento de sua equivalência substancial. O trabalho a seguir faz uma pequena revisão dos aspectos positivos e negativos da equivalência substancial, e a necessidade do desenvolvimento de testes que avaliem a toxicidade, alergenicidade e outros efeitos inesperados que tragam riscos à saúde humana. Paralelamente, aborda tópicos relacionados ao milho Bt, em que foi inserido o gene cry1Ab do *Bacillus thuringiensis*, e que está de alguma forma sendo consumido ou na ração para animais, ou na alimentação do brasileiro. Vale ressaltar ainda, que o princípio da precaução é a melhor estratégia para prever e preparar a liberação de organismos geneticamente modificados e seus produtos na cadeia alimentar, e é importante que se tenham resultados cientificamente embasados para avaliação de domínio público.

Palavras-chave: segurança alimentar, transgênicos, alimentos geneticamente modificados.

TITLE: The discord grains and table risks. A transgenic corn and food safety approach.

ABSTRACT : In agreement with the speed biotechnology has been developing new transgenic plants and the difficulty that has been found in guaranteeing that the product of the technology does not bring risks to human health, it has been necessary an alternative approach for the genetically modified food safety evaluation, wich is based on the establishment of its substantial equivalence. The following paper does a small review of positives and negatives aspects from the substantial equivalence, and the need of tests development that evaluate the toxicity,

allergenicity and other unexpected results that might bring risks to human health. Besides, the paper approaches topics related to the Bt corn, in which the *Bacillus thuringiensis* cry1Ab gene was inserted, and that is somehow being consumed in Brazil, whether for animal or human feeding. It's still worth to stand out that precaution's principle is the best strategy to predict and prepare the genetically modified organisms and its products' release in the food chain, and it's important to have scientifically based results for public domain evaluation.

Key words: food safety, transgenic, genetically modified foods.

INTRODUÇÃO

Historicamente, um alimento utilizado de maneira tradicional é considerado seguro com base na experiência adquirida ao longo do tempo. A seleção destes alimentos se dá escolhendo o que há na natureza, alguns por serem saudáveis, outros tóxicos ou não comestíveis. Reconhece-se que alimentos podem conter vários antinutrientes e toxinas que, em determinados níveis de consumo, podem induzir efeitos deletérios em seres humanos e animais (Kuiper et al, 2001). Muitos alimentos tradicionais são considerados seguros, embora esses mesmos alimentos possam não ser seguros sob determinadas circunstâncias. Entretanto, no que se refere à tecnologia de alimentos, a introdução de novas tecnologias sempre foi acompanhada de controvérsia (Watanabe e Nutti, 2002).

Produtos geneticamente modificados não são inerentemente perigosos. A modificação genética tem sido utilizada na produção de produtos farmacêuticos há 25 anos, sem que tenham sido documentados casos de perigos atribuídos ao processo de modificação genética. Consumidores norte-americanos têm consumido muitos alimentos geneticamente modificados, cultivados em mais de cem milhões de hectares, desde 1994. Não existem casos documentados de perigos atribuíveis ao processo pelos quais os produtos geneticamente modificados foram desenvolvidos (Mhughen, 2000).

Uma das maiores preocupações dos consumidores em relação aos transgênicos e tecnologias relacionadas é que nem todos os riscos tenham sido avaliados. Isto se deve ao fato de que riscos não previsíveis ou inesperados poderiam acarretar consequências à saúde pública. A carência de dados científicos dificulta uma avaliação conclusiva sobre o uso de geneticamente modificados. Considerando a rapidez com que os produtos resultantes da moderna biotecnologia vêm sendo disponibilizados e aprovados para seu uso comercial e alimentar, considera-se de fundamental importância buscar metodologias de avaliação da segurança dos alimentos desenvolvidos a partir da tecnologia do DNA recombinante, para que os mesmos possam ser avaliados caso a caso (conforme prevê a Instrução Normativa nº20 – CTNBIO, 2001).

A maioria das pesquisas em melhoramento de plantas nas duas últimas décadas tem sido direcionada para aumentar a produtividade e a resistência dos vegetais à doenças e pragas. Atualmente, porém, a aplicação da biotecnologia às

plantas tem se voltado também para elevar a sua qualidade nutricional (Zimmermann & Hurrell, 2002). Produtos com características que promovem melhoras na saúde do consumidor, como o arroz dourado ou o óleo vegetal rico em tocoferol (alimentos funcionais) ou produtos contendo medicamentos e outros componentes importantes para a saúde humana e produção animal (biofábricas), resultariam numa “revolução da saúde” promovida por produtos geneticamente modificados (Portugal et al., 2001).

O primeiro caso de liberação comercial de uma planta transgênica no Brasil foi o da soja Roundap Read (RR), da Monsanto. O principal argumento apresentado pela CTNBIO para sua liberação foi de que se tratava de espécie autógama (autofecundação) e sem parentes silvestres no país. Já a segunda e última liberação foi a do algodão Bt, também da Monsanto, trata-se de uma espécie alógama (fecundação cruzada) com parentes silvestres no Brasil. O parecer que liberou a soja RR foi contrário ao do algodão, e estas contradições afloram ainda mais a desconfiança da opinião pública a respeito dos produtos geneticamente modificados (ANBIO, acesso em 18/02/2006).

O país que mais aumentou o cultivo de plantas geneticamente modificadas em 2005 foi o Brasil, com um aumento de área estimado provisoriamente em 4,4 milhões de hectares (9,4 milhões de hectares em 2005 comparados aos 5 milhões em 2004), seguido pelos Estados Unidos (2,2 milhões de hectares), Argentina (0,9 milhões de hectares) e Índia (0,8 milhões de hectares). A Índia apresentou o maior aumento proporcional anual, quase triplicando sua área de 500.000 hectares em 2004 para 1,3 milhões de hectares em 2005 (ANBIO, acesso em 18/02/2006).

O milho Bt não está liberado para comercialização no Brasil, apesar de terem sido encontradas no noroeste do Rio Grande do Sul plantações do milho geneticamente modificado Bt e de ter sido importado da Argentina para ração animal. O seu emprego na cadeia alimentar tanto *in natura* como processado deve ser acompanhado de investigações que permitam avaliar a segurança do seu uso.

A transformação genética de plantas

A transformação genética é definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor (Tacchini e Walbot, 1986). Esta técnica tem sido recentemente utilizada para obtenção de características antes não existentes em um organismo, ou presente, mas com pouca expressão. O organismo, produto desta transformação genética, é chamado popularmente de transgênico.

Inúmeras são as características que podem ser obtidas com os transgênicos sendo possível a transferência de gene de espécies completamente distintas como, por exemplo, de bactérias para plantas. A transformação genética amplia consideravelmente os limites de disponibilidade de genes impostos pela incompatibilidade de reprodução natural entre espécies.

Uma vez que o gene é identificado como responsável por determinada característica, este pode ser isolado, clonado, seqüenciado e utilizado em programas de melhoramento genético de plantas, por meio da transformação genética (Brasileiro e Dusi, 1999). Após a transformação, ainda se faz necessário o uso do melhoramento tradicional para introduzir o gene em plantas mais adaptadas e selecionar plantas que poderão posteriormente entrar no mercado com potencial para concorrer com materiais não modificados.

Genes de *Bacillus thuringiensis* utilizados em transformação genética de plantas

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva que tem sido utilizada como bioinseticida contra lepidópteros desde 1959 (Navon, 2000). A partir de 1990, seu uso cresceu devido ao aparecimento de produtos combinados para atingir um maior espectro de espécies de insetos. Com introdução de partes do DNA da bactéria em plantas de interesse, novas estratégias de manejo foram adotadas, aumentando o conhecimento das interações entre insetos, Bt e o ambiente (Navon, 2000).

A bactéria produz uma variedade de cristais de proteínas que têm ação inseticida. Até hoje foram caracterizadas mais de 50 genes com propriedades inseticidas derivados deste microrganismo, sendo que muitas delas podem ser desenvolvidas simultaneamente (Van Rie *et al.* 1990). A ação tóxica das proteínas é oral e, portanto a praga morre quando se alimenta das folhas e/ou outras partes da

planta geneticamente modificada, ocorrendo dessecação do tubo digestivo. Os genes que codificam estas proteínas têm sido introduzidos em plantas com sucesso, tais como milho, algodão, arroz, tomate, batata, brócolis e berinjela. A expressão dos genes em plantas resulta em resistência a campo contra insetos da ordem lepidóptera (Mandaokar *et al.* 2000), permitindo o controle de insetos sem que haja a necessidade de sucessivas pulverizações de inseticidas químicos.

Em 1999, os produtores americanos cultivaram cerca de oito milhões de hectares com culturas contendo os genes provenientes do Bt reduzindo, em muito, o ataque de pragas e conseqüentemente o uso de inseticidas (Mandaokar *et al.* 2000).

Diversas companhias produtoras de sementes têm se utilizado destes genes em seus novos produtos. Na tabela 1 encontra-se uma lista das maiores corporações envolvidas no desenvolvimento de culturas transgênicas a partir dos genes obtidos do Bt.

Tabela 1. Empresas que desenvolvem plantas transgênicas contendo genes do Bt.

Empresa	Gene Bt ¹	Principal cultura	Fase (ensaios de campo/comercialização) ²
Aventis	<i>cry1Ab</i>	Batata	Pequena escala
	<i>cry1Ab</i>	Milho	Pequena escala
Cyanamid americana	<i>cry1Ac</i>	Algodão	Pequena escala
Cargill (Monsanto)	CBI-Bt	Milho	Pequena escala
DeKalb Genetics	<i>cry1Ab</i>	Milho	Grande escala
Delta and Pine Land ³	<i>cry1Ac</i>	Algodão	Comercialização (1996)
DowElanco	<i>cry1Ac</i>	Milho	Pequena escala
ELM/Asgrow	CBI-Bt	Milho	Pequena escala
Frito Lay	<i>cry3Aa</i>	Batata	Pequena escala
Genetic Enterprises	CBI-Bt	Milho	Pequena escala
Hunt Wesson	<i>cry1Ab</i>	Milho	Pequena escala
Miles	<i>cry1Ac</i>	Algodão	Pequena escala
Monsanto ⁴	<i>cry1Ac</i>	Algodão	Larga escala
	<i>cry1Ac</i>	Tabaco	Pequena escala
	<i>cry1Ab</i>	Milho	Comercialização (1996)
	<i>cry1Ab</i>	Tomate	Larga escala
	<i>cry1Ac</i>	Algodão	Larga escala
	<i>cry3Aa</i>	Batata	Comercialização (1995)
	<i>cry1Aa</i>	Algodão	Comercialização (1995)
	<i>cry1Ac</i>	Algodão (com tolerância a herbicida)	Comercialização (1996)
	CBI-Bt	Milho	Pequena escala
Mycogen	<i>cry1Ab</i>	Milho	Comercialização (1996)
	<i>cry1Ab</i>	Algodão	Larga escala
	<i>cry1Ab</i>	Tomate	Pequena escala
	<i>cry1Ab</i>	Canola	Larga escala
Novartis ⁵	<i>cry1Ab</i>	Milho	Comercialização (1995)
	<i>cry1Ab</i>	Tabaco	Pequena escala
	<i>cry1Ab</i>	Algodão	Pequena escala
	<i>cry1Ab</i>	Tomate	Pequena escala
	<i>cry1Ab</i>	Milho	Pequena escala
Pionner Hi-Bred International	<i>cry1Ab</i>	Milho	Larga escala
Rohm and Haas	<i>cry1Ab</i>	Tabaco	Pequena escala

1. CBI-Bt: informação confidencial, 2. O ano quando citado indica ano de comercialização nos EUA 3. Delta and Pine Land Co. comercializa algodão sobre licença da Monsanto, 4. Inclui Calgene sendo a Monsanto proprietária de mais da metade e 5. Ciba e Sandoz (incluindo Northrup King, Rogers NK e S & G Seeds). Tabela compilada de Kough & Watson, 1999. Obs: Algumas dessas empresas passaram por processos recentes de fusão, compra e venda, portanto os nomes podem não corresponder à situação legal atual das mesmas.

No Brasil, empresas e instituições públicas interessadas em trabalhar com culturas transgênicas devem submeter um projeto à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) para que possam desenvolver ensaios a campo. A implantação dos campos experimentais só deve ocorrer após aprovação emitida pelo órgão competente e publicado no Diário Oficial da União (www.ctnbio.gov.br). Na tabela 2 estão relacionadas as culturas e genes provenientes do Bt aprovados pela CTNBio para ensaios de campo, bem como estudos agrônômicos em território nacional.

Tabela 2. Liberações controladas pela CTNBIO para ensaios de campo de plantas transgênicas.

Cultura	Empresa	Gene	Ensaio aprovado
Algodão	Monsanto do Brasil Ltda.	<i>cry1Ab</i>	18
		<i>cry1Ac</i>	34
Cana-se-açúcar	Cooperativa de Produtos de Cana e Álcool do Estado de São Paulo	<i>cry1Ab</i>	3
Milho	Braskalb Agropecuária Brasileira Ltda.	<i>cry1Ab</i>	80
	Cargill Agrícola S/A	<i>cry1Ab</i>	144
		<i>cry9c</i>	4
	Novartis Seeds Ltda	<i>cry1Ab</i>	98
		CRWT	11
	Pioneer Sementes Ltda	<i>cry1Ab</i>	59
		Confidencial	15
		ICP	1
		Confidencial	2
	Sementes Agrocere S.A.	<i>cry1Ab</i>	44
		<i>cry1F</i>	2
	Sementes Monsanto Ltda.	<i>cry1Ab</i>	12
		<i>cry1Ac</i>	25
<i>cry1Ab</i>		16	
<i>cry1Ac</i>		40	
<i>cry1Ac</i>		2	
Soja	Monsanto do Brasil Ltda.	<i>cry1Ab</i>	2
		<i>cry1Ac</i>	10

Dados obtidos na home page da CTNBio: www.ctnbio.gov.br/ctnbio/sistema/LIBERAÇÃOESogmresp.asp em 18 de dezembro de 2005.

O gene *cry1Ab* inserido no milho transgênico

O gene *cry1Ab* proveniente do *Bacillus thuringiensis* codifica a proteína Cry1Ab. As proteínas que foram obtidas pela expressão do DNA inserido em milho são similares àquelas produzidas pela bactéria Bt e são ativas contra os insetos alvo, em geral lepidópteros (Kough & Watson, 1999).

O gene sintético *cry1Ab* foi produzido baseado em um cristal protéico do *Bacillus thuringiensis* variedade *kurstaki* (Btk). Esse gene codifica a proteína Cry1Ab que contém porções de aminoácidos idênticas aos encontrados no organismo em seu ambiente natural, correspondendo também à proteína da formulação comercial do Btk (Dipel®). As modificações do gene incluíram mudar seqüências genéticas de DNA, destinadas a realçar a expressão em plantas. As modificações não resultaram em nenhuma mudança de seqüência de aminoácidos na proteína codificada pelo gene (Hofte & Whiteley, 1989).

A proteína Cry1Ab pode ser expressa em diferentes níveis e partes distintas da planta. Na Tabela 3 encontram-se os níveis de expressão e parte da planta onde a referida proteína ocorre (EPA, 1998).

Tabela 3. Expressão da proteína Cry1Ab em tecidos vegetais.

Proteína	Folha	Raiz	Pólen	Sementes	Planta inteira
Cry1Ab Bt11 (Novartis)*	3,3 ng/mg	2,2-37,0 ng/mg	<90 ng/ g peso seco de pólen	1,4 ng/mg (espiga)	-
Cry1Ab Mon810 (Monsanto)*	10,34 µg/g	-	<90 ng/ g peso seco de pólen	0,19-0,39 µg/g (grão)	4,65 µg /g

* Empresas detentoras dos genes descritos

O gene *cry1Ab* tem 3468 nucleotídeos e codifica uma proteína completa, B.t.k.HD-1[CryIA(b)], de 1156 aminoácidos (Fischhoff *et al.* 1987) que, quando submetida a tripsina produz uma proteína ativa, resistente à tripsina, com aproximadamente 600 aminoácidos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Perlak *et al.* 1991).

A Composição Centesimal do Milho Transgênico e do Milho Isogênico

A composição do milho transgênico e do milho isogênico foi determinado em alguns estudos. Flachowsky & Chesson (2003) citaram os trabalhos de autores que compararam os constituintes do produto, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4. Seleção dos constituintes (g/kg) de milho transgênico resistente a insetos (Bt) comparado ao milho isogênico.

Parâmetros	Milho isogênico	Milho Bt
Nutrientes		
Cinzas	15	16
Proteína bruta	108	98
Gordura bruta	54	56
Fibra bruta	23	25
Amido	710	708
Açúcares	na	na
Minerais		
P	3,7	3,2
Mg	1,2	1,2
Ca	0,03	0,04
Aminoácidos		
Lisina	2,9	3,0
Metionina	2,2	2,1
Cisteína	2,5	2,4
Ácidos graxos (% de ácidos graxos totais)		
C16: 0	12,4	12,5
C18: 1	31,1	28,6
C18: 2	50,0	51,2

n.a: não analisado

Adaptado de Flachowsky & Chesson, 2003.

Os resultados dos dados apresentados revelam que não há diferença de composição centesimal nas fontes contendo material derivado de plantas geneticamente modificadas em comparação com variedades não modificadas geneticamente (Flachowski & Chesson, 2003).

Segurança Alimentar

Normas de segurança: Instrução Normativa CTNBIO nº 20, de 11.12.2001

A CTNBIO, criada no âmbito do Ministério da Ciência e Tecnologia, tem a finalidade de prestar apoio técnico consultivo e de assessoramento ao governo federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a organismos geneticamente modificados (OGM). Estabelecendo normas técnicas de segurança e pareceres técnicos conclusivos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo e armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados (Lajolo & Nutti, 2003). A instrução normativa nº20, dispõe de normas para avaliar a segurança alimentar de plantas geneticamente modificadas ou de suas partes. As normas se aplicam à produção, importação e comercialização de plantas geneticamente modificadas destinadas à alimentação humana ou animal. Após o parecer conclusivo da CTNBIO, sobre a segurança alimentar do produto, os alimentos transgênicos, poderão ser liberados pelas autoridades federais.

Estas questões devem ser respondidas pelos proponentes do produto e apresenta um fluxograma que estabelece os procedimentos de avaliação de segurança alimentar. Funcionam como uma lista de itens a serem estudados para a futura liberação, e o proponente deve apresentar relatório com estes dados respondidos, podendo um CTNBIO solicitar informações adicionais (<http://www.ctnbio.gov.br>).

As questões se dividem em:

1. Relativas ao organismo doador: se já é usado na produção de alimentos ou como alimento, se há necessidade de algum processamento, se tem característica de alergenicidade ou de toxicidade.
2. Relativas à planta receptora: a proteína especificada pode ser alergênica ou tóxica, se a planta já é usada como alimento, se há necessidade de processamento, ou se a planta receptora tem características de alergenicidade ou de toxicidade.
3. Relativas à proteína expressa no Vegetal Geneticamente Modificado (VGM): se o teor da proteína transgene é comparável ao teor no organismo doador ou outros alimentos, se a proteína expressa apresenta algum risco à saúde humana

ou animal e se a proteína pode ser um macrocomponente na dieta humana ou animal.

4. Relativas à qualidade nutricional: se necessitar algum processamento anterior ao consumo, se há diferença significativa entre a composição química e nutricional do alimento transgênico e do vegetal não modificado *in natura* ou processado, se a qualidade nutricional foi alterada (apresentar resultados experimentais), se alimentos derivados de animais alimentados com VGMS *in natura* ou processado apresentam diferenças na composição química ou características nutricionais. Os novos carboidratos ou carboidratos modificados e óleos ou gorduras novos ou modificados houve alteração na estrutura, composição ou teor dos nutrientes, modificando ou não a qualidade nutricional, ou que afetando a digestibilidade.

5. Relativas a alergenicidade: se existe identidade ou similaridade da estrutura primária da proteína em relação a alérgenos conhecidos, a afinidade imunoquímica pelo anticorpo IgE do soro de indivíduos alérgicos à fonte do material genético transferido, e a estabilidade à digestão e ao processamento industrial da proteína especificada pelo transgene.

6. Relativas a outros efeitos adversos: se o vegetal geneticamente modificado produz metabólitos causando efeitos adversos à saúde, e se estes metabólitos se concentram na cadeia alimentar e tornar-se tóxico; se foi produzido alguma proteína, lipídio ou carboidrato incomum ou tóxico, e se há evidências de transferência horizontal para o genoma do homem ou animal.

A Instrução Normativa nº20 é mais um passo que demonstra estar o Brasil no mesmo patamar de países como os da União Européia, a Austrália, a Nova Zelândia e o Japão, que estabelecem exigências de rigorosos testes de segurança alimentar antes que plantas geneticamente modificadas e seus derivados possam ser cultivados, comercializados e importados (Lajolo & Nutti, 2003).

Recomendações da FAO/OMS

A introdução de um produto geneticamente modificado em um organismo receptor não é precisamente um processo controlado, e pode ter vários resultados com respeito à integração, expressão e estabilidade do gene inserido no hospedeiro (WHO, 2003). A comissão do *Codex alimentarius* (código internacional sobre alimentos) é responsável em desenvolver normas, práticas e recomendações em

alimentos, e é formado pela FAO/OMS. O *Codex alimentarius* descreve metodologias para o desenvolvimento de avaliações da inocuidade em alimentos derivados de plantas e microorganismo com DNA recombinante (CAC, 2003).

O *Codex alimentarius* recomenda uma avaliação prévia à comercialização de produtos geneticamente modificados caso a caso, incluindo uma avaliação tanto dos efeitos diretos (do gene inserido) como dos efeitos não desejados (que podem surgir em consequência da inserção de um novo gene). O princípio da avaliação da inocuidade proposta pelo *Codex alimentarius* para alimentos geneticamente modificados requer investigar:

- a) Efeitos diretos sobre a saúde (toxicidade);
- b) Tendência a causar reações alérgicas (alergenicidade);
- c) Componentes específicos que poderiam ter propriedades nutricionais tóxicas;
- d) Estabilidade do gene inserido;
- e) Efeitos nutricionais associados com a modificação genética específica;
- f) Todo efeito não desejado que poderia originar da inserção do gene.

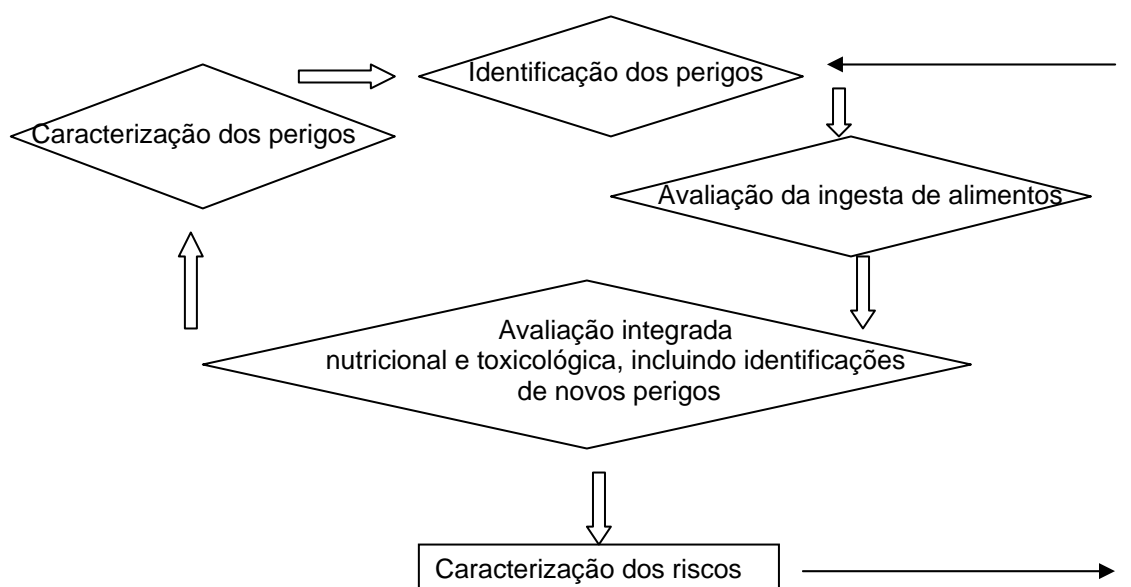


Figura 1: Esquema de um processo de avaliação de riscos sugerido pelo *Codex alimentarius* (FAO/OMS 2003)

Os efeitos potenciais diretos dos alimentos geneticamente modificados sobre a saúde são geralmente comparados aos riscos associados já conhecidos dos alimentos convencionais e incluem, por exemplo, o potencial de alergenicidade e a toxicidade dos componentes presentes, e da qualidade nutricional e inocuidade microbiológica dos alimentos. As dificuldades intrínsecas em se avaliar a toxicidade dos alimentos utilizando modelos animais têm originado o desenvolvimento de enfoques alternativos para a avaliação da inocuidade dos alimentos geneticamente modificados (OMS, 2005).

Os fatores que se leva em conta para a avaliação da inocuidade são:

- a) identidade dos genes de interesse, incluindo a análise seqüencial das regiões flaqueadoras e a quantidade de cópias (bioinformática);
- b) origem do gene de interesse;
- c) composição do OGM;
- d) produto da expressão protéica do novo DNA;
- e) potencial de toxicidade;
- f) potencial de alergenicidade;
- g) possíveis efeitos secundários da expressão genética e ruptura do DNA nas vias metabólicas, incluindo composição de macronutrientes, micronutrientes, antinutrientes, tóxicos endógenos, alergênicos e substâncias fisiologicamente ativas.

A equivalência substancial

As plantas transgênicas, aprovadas para o cultivo comercial nos Estados Unidos, tiveram sua liberação baseada no princípio da equivalência substancial. Para determinação da equivalência substancial, a composição do produto geneticamente modificado deverá ser comparada à composição de seu análogo convencional, preferencialmente a linhagem parental direta, que, em alguns casos, não está disponível (Watanabe & Nutti, 2002). As análises devem ser realizadas em plantas que tenham se desenvolvido sob condições ambientais similares, uma vez que estas podem levar a diferenças na composição não relacionadas à modificação genética (Watanabe & Nutti, 2002). Ao mesmo tempo, é necessário avaliar a nova variedade geneticamente modificada em diferentes locais (diferentes condições climáticas), com a finalidade de verificar se não houve alteração de rotas metabólicas, com possíveis efeitos adversos na composição da planta (Kuiper *et al.*, 2001).

Este conceito de equivalência substancial tem sido alvo de críticas, porque, entre outras razões a falta de critérios mais rigorosos pode ser útil à indústria, mas é inaceitável do ponto de vista do consumidor e da saúde pública (Millstone *et al.*, 1999). Há, portanto dificuldades práticas no conceito de equivalência entre plantas engenheiradas e naturais ou obtidas por técnicas convencionais de melhoramento genético, pois a rigor, genomicamente, elas não são equivalentes nem iguais (Nodari & Guerra, 2003). Esta estratégia foi introduzida na década passada para evitar que as indústrias tivessem custos maiores com testes de longa duração, como ocorreu na área farmacológica. Este princípio é equivocado e deveria ser abandonado em favor de testes biológicos, toxicológicos e imunológicos mais aprofundados e eficazes (Guerra & Nodari, 2001).

Ensaio de toxicidade oral

Poucas variedades tradicionais de alimentos têm sido objeto de avaliações toxicológicas como os produtos oriundos da biotecnologia, uma vez que, por causa de seu consumo comum são reconhecidas como seguras. No entanto, a introdução de novas tecnologias sempre foi acompanhada de controvérsias. O princípio da precaução considera um alimento sadio quando “existe uma certeza razoável de que nenhum prejuízo resultará do seu consumo sob as condições de uso estipuladas”

(Cockburn, 2002; Miraglia, 1998). Portanto, se fazem necessários testes para a avaliação da toxicidade de substâncias específicas caso a caso.

O requerimento mínimo necessário para demonstrar a segurança do consumo do alimento em longo prazo é a realização de um estudo subcrônico de 90 dias. Estudos mais longos podem ser necessários se os resultados do estudo subcrônico indicarem efeitos adversos (Kuiper *et al.*, 2001).

Os protocolos para a verificação da toxicidade de alimentos produzidos por biotecnologia não diferem do que é recomendado para analisar a segurança de qualquer produto (Costa & Borém, 2003). Inicialmente, caracteriza-se a relação dose-resposta e, assim, os diversos níveis de efeito. As tabelas 5, 6 e 7 descrevem alguns parâmetros que se pode utilizar para avaliar a resposta ao produto geneticamente modificado. Uma das considerações na avaliação da segurança desses alimentos é o possível reflexo da modificação genética em seus níveis de antinutrientes e toxinas.

Tabela 5: Parâmetros nas análises Hematológicas para efeitos na relação dose-resposta em ensaios de toxicidade oral.

PARÂMETRO HEMATOLÓGICOS	RESPOSTA
Contagem de eritrócitos (RBC)	a diminuição da contagem de eritrócitos indica anemia, devido à baixa concomitante de hemoglobina.
Hemoglobina (HGB)	é o dado básico do eritrograma, sua deficiência abaixo do seu limite é causa de anemia.
Hematócrito (HCT)	indica a viscosidade sangüínea (é o volume da massa eritróide de uma amostra de sangue).
Volume Corpuscular Médio (VCM)	usado para classificar anemias. É o parâmetro mais importante para o diagnóstico diferencial laboratorial dos diversos tipos de anemia.
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	é uma cifra pouco útil, pois é paralela ao VCM. Glóbulos grandes têm muita hemoglobina, glóbulos pequenos têm pouca.
Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	a concentração da hemoglobina dentro dos eritrócitos, calculada pelo quociente HCM/VCM, é notavelmente constante na faixa de normalidade. CHCM elevada indicam hemólise do material, coma hiperosmolar, desidratação dos eritrócitos ou excesso de EDTA no sangue colhido.
Plaquetas (PLT)	indica síndrome hemorrágica, trombocitose (doenças inflamatórias crônicas, não representa uma doença hematológica) e trombocitopenias (gravidez, púrpura, hemorragias tratadas com transfusões, viroses, esplenomegalia, doenças de medula óssea)

Fonte: adaptado de Failacce, R., 1995.

Tabela 6: Parâmetros nas análises Bioquímicas para efeitos na relação dose-resposta em ensaios de toxicidade oral.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	RESPOSTA
Fosfatase	a fosfatase alcalina está amplamente distribuída nos tecidos humanos. A forma predominante desta enzima origina-se do fígado e esqueleto. No fígado, a fosfatase está localizada na membrana celular, portanto está elevada nas desordens do trato biliar (carcinoma hepatocelular, metástases, abscessos, hepatites, cirroses, uso de fármacos).
Creatinina	a concentração da creatinina sérica é uma medida para avaliar a função renal. Qualquer condição que reduz a velocidade de filtração glomerular promove uma menor excreção urinária de creatinina, aumentando a concentração plasmática. Valores aumentados indicam a deterioração da função renal.
Uréia	o nível de uréia no plasma é afetado pela função renal, conteúdo protéico da dieta e teor do catabolismo protéico, estado de hidratação e presença de sangramento intestinal.
Transaminase glutâmica-oxalacética (TGO)	as aminotransferases estão amplamente distribuídas nos tecidos. Os aumentos estão associados a doenças hepatobiliares, infarto do miocárdio, distrofias musculares, embolia pulmonar, pancreatite aguda, insuficiência cardíaca congestiva. As enzimas são intracelulares e estão presentes no citoplasma do hepatócito. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam essas enzimas para a circulação. A TGP é encontrada principalmente no citoplasma e a TGO está nas mitocôndrias. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação TGO/TGP.
Transaminase glutâmica-pirúvica (TGP)	

Fonte: adaptado de Failacce, R., 1995.

Tabela 7: Parâmetros nas análises de Urina para efeitos na relação dose-resposta em ensaios de toxicidade oral.

URINA	RESPOSTA
Ácido Ascórbico	o excesso da vitamina é excretado pela urina. A sua deficiência está associada por hemorragias, fraqueza, gengivite, dificuldade de cicatrização e anemia.
Bilirrubina	a bilirrubina conjugada está presente na urina em enfermidades hepatocelular ou icterícia obstrutiva pelo seu extravasamento para a circulação.
Cetonas	o excesso desses compostos por distúrbios no metabolismo de carboidratos e lipídios provoca o aumento na concentração sangüínea e conseqüente excreção urinária
Glicose	quantidades significantes de glicose são detectadas na urina quando elevadas concentrações de glicose no sangue (diabetes). Também é encontrada na urina em enfermidades do túbulo proximal, que podem impedir a capacidade de absorção.
Nitritos	a detecção de nitritos é uma prova indireta para o diagnóstico de bacteriúria significativa e assintomática.
pH	o pH urinário reflete a capacidade do rim em manter a concentração normal dos íons hidrogênio no líquido extracelular. Normalmente o pH da urina varia entre 4,6 e 8,0.
Proteínas	proteínas na urina indicam lesão da membrana glomerular, comprometimento da reabsorção tubular, mieloma múltiplo, nefropatia diabética e proteinúria postural.
Sangue	a presença de hemácias na urina reflete sangramento no trato genitourinário, por infecções do trato urinário, cálculo renal, tumor do trato urinário, rim policístico e glomerulonefrite.
Urobilinogênio	pigmento biliar resultante da degradação da hemoglobina. Encontra-se na urina em hepatopatias e distúrbios hemolíticos.

Fonte: adaptado de Failacce, R., 1995.

Situação no Brasil

A estrutura do mercado brasileiro relacionado com os OGMs para a agricultura vem passando por grandes transformações, apontando para um cenário de concentração de mercado. As empresas multinacionais foram ampliando suas participações no mercado brasileiro através de fusões e aquisições, estimuladas pelo tamanho do mesmo, pela possibilidade de liberação definitiva para o plantio de OGMs em escala comercial (concretizada com a aprovação da lei de biossegurança em março de 2005) e também pelas sinergias com outras áreas de atuação, por exemplo, os agroquímicos (Castro, Pádula & Carvalho, 2005). Neste cenário, houve muitos entraves, entre eles a suspensão temporária do trabalho da CTNBIO em 2005 e a revisão de suas atividades. A soja polêmica passou a ter zonas livres de seu cultivo por decreto; portos foram proibidos de escoar a produção de soja transgênica para o mercado exportador; o milho argentino geneticamente modificado atende o mercado interno brasileiro, com a ressalva de ser utilizado apenas para a ração animal; e nos primeiros dias de 2006, o milho Bt é encontrado sendo cultivado no noroeste do Rio Grande do Sul (ANBIO). A atuação da CTNBIO na avaliação da segurança ainda é lenta e sem autonomia. Posteriormente aos seus relatórios, é

necessário que Ministérios da Saúde, Meio ambiente, Agricultura, Pecuária e Abastecimento, avaliem e aproveem para a comercialização do produto (Lajolo & Nutti, 2003).

Desde o Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003, foi estabelecido no Brasil, a definição de 1% no limite da presença de alimento geneticamente modificado. Acima deste nível, produtos embalados, a granel ou *in natura* que contenham ou sejam produzidos a partir de organismo geneticamente modificados, deverão ser rotulados, e o consumidor deverá ser informado sobre a espécie doadora do gene no local reservado para a identificação dos ingredientes.

CONCLUSÃO

Muitos alimentos tradicionais são considerados seguros, embora esses mesmos alimentos possam não ser seguros sob determinadas circunstâncias, isto é, reconhece-se que alimentos podem conter vários antinutrientes e toxinas que, em determinados níveis de consumo, podem induzir efeitos deletérios em seres humanos e animais. Na avaliação de segurança de compostos como pesticidas e aditivos alimentares, a utilização de estudos toxicológicos com animais encontra-se bem estabelecidas. Nestes casos, animais são alimentados diretamente com esses compostos, em doses muito superiores ao nível de exposição esperada para consumo humano. No caso de alimentos, esses fatores de segurança não seriam aplicáveis nos estudos toxicológicos, pois a dieta do animal teste deveria ser composta exclusivamente por este alimento. Os efeitos adversos poderiam estar relacionados ao desbalanceamento nutricional e não à modificação genética inserida no alimento testado. Conseqüentemente, as dificuldades para se aplicar testes toxicológicos tradicionais a alimentos fazem com que uma abordagem alternativa fosse requerida para a avaliação de segurança de alimentos transgênicos, o que levou ao estabelecimento de uma análise comparativa, definida caso a caso, onde os mesmos são comparados com seus análogos convencionais. Países onde a comercialização de alimentos transgênicos é permitida, os mesmos são submetidos, antes de serem aprovados para consumo, a um processo de avaliação de segurança que é constituído por diversos tipos de estudos: moleculares, agrônômicos, de composição, toxicológicos, de alergenicidade, de nutrição animal e de impacto ambiental. A avaliação de segurança de alimentos transgênicos ainda necessita elaboração adicional e harmonização internacional no que se refere à seleção de parâmetros críticos, requerimentos de testes de campos, análise estatística dos dados e interpretação dos mesmos no contexto das variações naturais. Tal trabalho vem sendo realizado pelo Codex Alimentarius e tem como objetivo garantir que todos os laboratórios envolvidos utilizem metodologias e condições de análise validadas e, assim, produzam resultados que tenham credibilidade internacional e que possam ser comparados entre si.

Enfim, o princípio da precaução deve ser aplicado para prever e preparar a liberação de OGM e seus produtos na cadeia alimentar, até que seus impactos na saúde e no meio ambiente sejam devidamente avaliados.

REFERÊNCIAS

- BRASILEIRO, A.C.M., DUSI, D.M.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, p.679-718. Embrapa. Brasília. 1999.
- CASTRO, C. C., PÁDULA, A. D., CARVALHO, G. A. O mercado e a tecnologia dos organismos geneticamente modificados (OGMs). **Anais do IV Congresso Brasileiro e IV Simpósio Latino-Americano de Produtos Transgênicos**, Porto Alegre, RS, 2005.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC), 2003. Codex AD HOC Intergovernmental task force on foos derived from Biotechnology. Matters referred to the task force by other Codex committees. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp Acesso em: 18 janeiro, 2006.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC), 2002. Codex AD HOC Intergovernmental task force on foos derived from Biotechnology. Matters of interest from other International Organizations with respect to the evaluation of the safety and nutrition aspects of foods derived from Biotechnology. Japan. March, 2002.
- COSTA, N. M. B., BORÉM, A. **Biotecnologia e Nutrição: saiba como o DNA pode enriquecer os alimentos**. Ed. Nobel, São Paulo, 2003.
- CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança). Instrução Normativa nº20, de 11.12.2001. In: on-line. Dispõe sobre as normas para avaliação da segurança alimentar de plantas geneticamente modificadas ou de suas partes e dá outras providências. Disponível em: <http://www.ctnbio.org.br/legislação> Acesso em: 05 janeiro,2006.
- EPA. Bt plant-pesticides biopesticides registration action document. 1998.
- FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**, 3ª. edição. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.
- FISCHOFF, D.A., BOWDISH, K.S., PERLAK, F.J., MARRONE, P.G., MCCORMICK, S.M., NIEDERMEYER, J.G., DEAN, D.A., KUSANO-KRETZMER, K., MAYER, E.J., ROCHESTER, D.E., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T. Insect tolerant tomato plants. **Biotech**. v.5, p.807-813, 1987.
- FLACHOWSY, G. CHESSON,A. Fornecimento de Plantas Geneticamente Modificadas em Nutrição Animal. **Waap Book of the year**, p.41-267, 2003.
- HAMMOND, B., DUDEK, R., LEMEN, J., NEMETH, M. Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1003-1014, 2004.
- HOFTE, H., WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.** v.53, p.242-255, 1989.

- KÖNIG, A., COCKBURN, A., CREVEL, R. W. R., DEBRUYNE, E., et al. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. **Food and Chemical Toxicology**, 42, p.1047-1088, 2004.
- KOUGH, J.; WATSON, M.T. Environmental fate and effects risk assessment. **Bt plant-pestic. Biopestic. Registrat. action doc.** U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division. p. 1-14, 1999.
- KUIPER, A. H., KLETER, A.G., NOTEBORN, H. P. J. M., KOK,E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified food. **The Plant Journal**, 27, p.503-528, 2001.
- LAJOLO, F.M., NUTTI, M.R. **Transgênicos:bases científicas da sua segurança.** São Paulo, SP. SBAN, 112p., 2003.
- MANDAOKAR, A.D.; GOYAL, R.K.; SHUKLA, A.; BISARIA, S.; BHALLA, R.; REDDY, V.S.; CHAURASIA, A.; SHAMA, R.P.; ALTOSAAR, I.; KUMAR, A.P. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera hubner*). **Crop Protec.** v.19, p.307-312, 2000.
- MCHUGHEN, A. **Biotechnology and Food.** 2.ed. New York: ACSH, 42p., 2000.
- MILLSTONE, E., BRUNNER, E. MAYER, S. Beyond “substantial equivalence”. **Nature**, London, v.401,n.673, p.525-526, 1999.
- MONSANTO DO BRASIL Ltda. Proposta de liberação planejada no meio ambiente da linhagem de milho MON810 geneticamente modificada com o gene de resistência a insetos **cry1Ab**-Milho yieldgard. Documento entregue a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBIO, 1997.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações**, 4ª. edição. Caxias do Sul: EDUCS, 2003.
- NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* inseticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Protec.** V. 19, p. 669-676, 2000.
- NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar (Biossegurança de plantas transgênicas). **Rev. Nutr.**, Campinas, v.16, p.105-116, 2003.
- NODARI, R.O., GUERRA, M.P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.18, n.1, p.81-116, 2001.
- PERLAK, F.J.; FUCHS, R.L.; DEAN, D.A.; MACPHERSON, S.L.; FISCHHOFF, D.A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect cotton protein genes. **PNAS.** v.88, p.3324-3328, 1991.

- PORTUGAL, A. D., SAMPAIO, M.J., CONTINI, E., ÁVILA, F. Agricultural biotechnology in Brasil- institutional and implications of genetically modified organisms. 5th International Conference of the International Consortium on Agricultural Biotechnology Research (ICABR) on "Biotechnology, science and Modern Agriculture : A New Industry at the Daw of the Century", Italy, 2001.
- TACCHINI, P.; WALBOT, V. Transformation of plants. **Nestlé Resear. News**, p.19-29, 1986.
- VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Appl. Environ. Microbiol.** V.56, p.1378-1385, 1990.
- WATANABE, E., NUTTI, M. R. Alimentos Geneticamente Modificados: Avaliação de Segurança e Melhorias de Qualidade em Desenvolvimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.1, p. 1-14, 2002.
- World Health Organization, 2003 (WHO). Legislação para recomendações de produtos derivados da biotecnologia. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/20questions/en/index.html> Acesso em: 20 janeiro 2006.
- World Health Organization, 2005 (WHO). Modern food biotechnology, human health and development: an evidence- based study. Food Safety department, Geneva, Switzerlan. Disponível em : <http://www.who.int/foodsafety> Acesso em: 19 janeiro 2006.
- ZIMMERMANN, M. B.; HURREL, R. F. Improving iron, zinc and vitamin A nutrition through plant biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, 13, 142-145, 2002.

ARTIGO 2

“RESPOSTA SUBCRÔNICA AO CONSUMO DE MILHO TRANSGÊNICO E DA PROTEÍNA Cry1Ab ADICIONADOS À DIETA DE CAMUNDONGOS”

Artigo escrito conforme como normas de submissão de trabalhos da Revista Ciência e de de Tecnologia Alimentos, SP.

RESPOSTA SUBCRÔNICA AO CONSUMO DE MILHO TRANSGÊNICO E DA PROTEÍNA Cry1Ab ADICIONADOS À DIETA DE CAMUNDONGOS

Janáina Guimarães VENZKE¹ *, Vinícius Coitinho TABELÃO², Jamila Schuch VENZKE³, o Leonor Almeida de Souza SOARES⁴.

¹Centro de Biotecnologia Universidade Federal de Pelotas/RS. Campus Universitário, s/nº, Caixa Postal, 234, Pelotas/RS, Brasil, e-mail: janaina_venzke@ufpel.edu.br

²Mestrado em Clínica Veterinária - Faculdade de Veterinária - Universidade de Federal Pelotas/RS, Brasil. e-mail: tableao@terra.com.br

³Graduação Psicologia. Universidade de Católica Pelotas/RS, Brasil.

⁴Biotério Central, UFPEL e Programa em de Pós-Graduação Engenharia e de Ciência Alimentos-Fundação Universidade Federal fazem Rio Grande/RS, Brasil. E-mail: lassoares@brturbo.com.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

RESUMO

O desenvolvimento rápido e crescente dos produtos biotecnológicos pode contribuir no melhoramento genético de plantas, visando a obtenção de características agrônomicas, qualidade nutricional ou como “biofábricas” na produção de vacinas e enzimas de uso industrial. Não obstante, o maior problema na análise de risco destes organismos gerados pela biotecnologia é que seus efeitos não podem ser previstos em sua totalidade. Os riscos à saúde humana incluem aqueles inesperados, alergias, toxicidade e intolerância. O presente estudo relata a relação dose-resposta camundongos BALB/c alimentados com milho Bt com dosagem de 10% e 30%, e dieta adicionada de endotoxina Cry1Ab em pó (comercialmente utilizada como Dipel®) comparadas a um grupo controle que recebeu dieta acrescida de milho parental. Os parâmetros avaliados foram consumos de alimento e de água, ganho de peso, eficácia alimentar e comportamento animal. Os resultados obtidos apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos Cry1Ab, 10% e 30% de milho Bt, quando comparados ao grupo controle nos parâmetros ganho de peso e eficácia alimentar. O comportamento animal de maior atividade pode ter relação com o baixo ganho de peso do grupo controle.

Palavras chaves: segurança alimentar, transgênicos, Cry1Ab, segurança nutricional.

ABSTRACT

Sub-chronic answer to transgenic corn and Cry1Ab protein consume, when added to mice's diet.

The fast and growing development of biotechnological products may contribute to plants genetic improvement, aiming at agronomic characteristics, nutritional quality or as “bio-factories” for the industrial use vaccines and enzymes production. In spite of that, the biggest issue at these biotech organisms risk analysis is that its effects cannot be totally predicted. Risks to human health include those unexpected, allergies, toxicity and intolerance. This study relates the dose-answer relation of BALB/c mice fed with transgenic corn on 10% and 30% dosage, and powder Cry1Ab endotoxin (commercially used as Dipel®) added in their diet, compared to a control group that received its diet enhanced with parental corn. The evaluated parameters

were: food and water consume, weight gain, feeding conversion and animal behavior. The obtained results did not presented statistic differences among the Cry1Ab, 10% and 30% transgenic corn groups, when compared to the control group. The animal behavior recurrent of higher activity may be related to the low weight gain in the control group. The parameters used (weight gain and feeding consume) don't seem to be enough sensitive to indicate possible harmful effects related to the genetically modified product and the Cry1Ab protein.

Keywords: food safety, transgenic, Cry 1Ab, nutritional assessment.

1.INTRODUÇÃO

O rápido e crescente desenvolvimento de produtos biotecnológicos pode contribuir de forma significativa no melhoramento genético de plantas, visando a obtenção de características agronômicas desejáveis, melhor qualidade nutricional ou para fins de produção de vacinas e enzimas de uso industrial. O impacto destas modificações na saúde humana e no ambiente deve ser criteriosamente avaliado, e a falta de dados científicos dificulta uma avaliação conclusiva do uso de alimentos geneticamente modificados. Os alimentos serão considerados seguros desde que nenhum dano ou efeito indesejável resulte de seu consumo [5].

Segundo Wal [20], a avaliação da segurança alimentar deve estudar dois aspectos fundamentais: a ausência de toxicidade e o valor nutricional do novo alimento. Alguns dados são exigidos para estabelecer a segurança dos produtos produzidos por uma tecnologia nova e que envolva possível risco à saúde humana. Os dados avaliados visam especialmente determinar o potencial alergênico da nova proteína presente, a termoestabilidade, a análise bioquímica de taxas de glicosilação, a toxicidade da proteína expressa pelo gene introduzido ou metabólito de sua ação. Os efeitos secundários da inserção do gene, o risco teórico de mutagênese pela inserção do gene com alteração da expressão habitual de outros genes e a ativação de genes silenciosos ou pouco expressos, provocando biossíntese de metabólitos tóxicos também são importantes para garantir a segurança dos novos produtos [14].

Internacionalmente, parâmetros para avaliação da segurança alimentar de produtos obtidos através da engenharia genética têm sido definidos desde a década de 80. A Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento, Organização para a Agricultura e Alimentos e a Organização Mundial da Saúde, têm se empenhado no desenvolvimento de estratégias para garantir a segurança alimentar dos produtos geneticamente modificados [14]. Pesquisadores desenvolveram procedimentos básicos para identificação de compostos tóxicos e carcinogênicos prejudiciais à saúde humana assimilados pela exposição a alimentos, água, produtos farmacêuticos ou outras fontes contaminadas do ambiente [1]. Estudos feitos com roedores na Nova Zelândia, Zhang et al. [21] demonstram que os roedores são mais tolerantes a produtos farmacêuticos do que seres humanos. Eles validam a toxicidade do uso do chá de chifre de veado em roedores para determinar

a segurança para o consumo humano. Roedores de laboratório têm a vantagem de serem estáveis, podem ser analisados sempre que necessário e são facilmente manejáveis [15].

Todas as mudanças não intencionais podem ocorrer também nos processos convencionais de melhoramento, até em maior proporção devido à sua inespecificidade, o que faz com que, em ambos os casos, sejam necessárias avaliações da segurança dos produtos resultantes [13]. Por isso desenvolveram-se princípios, estratégias e metodologias que vêm sendo discutidos em âmbito nacional e internacional e aplicados quando da aprovação de um produto geneticamente modificado [13].

O presente estudo foi realizado com o objetivo de buscar métodos de avaliação da segurança alimentar de milho Bt em camundongos, contendo o *gene cry1Ab* do *Bacillus thuringiensis*, adicionado na dieta alimentar dos animais. Foram analisados as variáveis resposta: consumo alimentar e de água, ganho de peso, eficácia alimentar e atividade, observando o comportamento do animal, no período experimental de 90 dias.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Origem do material

O milho Bt e seu análogo usado para o desenvolvimento da pesquisa, originam da empresa Sementes Monsanto Ltda., e foram obtidos através de parceria do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e Instituto CENA da Universidade de São Paulo.

2.2 – Animais

Foram utilizados 32 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade provenientes do Biotério Central da Fundação Estadual de Ensino e Pesquisa em Saúde (FEEPS), de Porto Alegre/RS.

2.3 - Preparo das dietas

Foram preparados quatro tipos de dietas: controle (sem adição de milho Bt), Cry 1Ab (acrescido 10% do produto comercial Dipel® utilizado na pulverização das plantações), 10% (adicionada esta quantidade de milho Bt) e 30% (acrescentada esta quantidade de milho Bt à dieta), conforme as recomendações de HERMAN et al. [9]. A quantidade de milho geneticamente modificada e a endotoxina da Cry1Ab, foram calculadas estimando a quantidade de milho utilizado diariamente na dieta de humanos [11, 17, 12, 8]. As dietas foram confeccionadas semanalmente, no Laboratório de Processamento de Alimentos do Departamento de Química de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), e oferecidas diariamente aos animais, em quantidade suficiente para garantir o consumo *ad libitum*. Os teores de vitaminas, sais minerais, fibras e demais nutrientes foram equilibrados segundo as recomendações da American Institute of Nutrition (AIN 93) para roedores [16] e submetidas à análise de composição proximal no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Química de Alimentos UFPel/RS. A composição das dietas experimentais está indicada na Tabela 1.

Tabela 1. Formulação básica das dietas (g/Kg).

Ingredientes	Dietas (g)			
	controle	Cry1Ab	10%	30%
Farinha de milho convencional	400	360	360	280
Farinha de milho Bt	-	-	40	120
Amido de milho comercial	120	120	120	120
Caseína	100	100	100	100
Malto Dextrina	112	112	112	112
Sacarose	100	100	100	100
Celulose microcristalina	50	50	50	50
L-cistina*	3	3	3	3
Colina*	2,5	2,5	2,5	2,5
Mistura de minerais *	35	35	35	35
Mistura de vitaminas *	10	10	10	10
Óleo de soja (ml)	70	70	70	70
Produto Dipel®	-	40	-	-

* De acordo com AIN 93.

2.4 - Ensaio biológico

Os camundongos fêmeas da linhagem BALB/c foram criados em isoladores, em grupos de 4 animais acomodados em oito gaiolas metabólicas, nas dependências do Biotério Central da UFPel/RS. Os camundongos tiveram uma semana para adaptação às condições de criação, ou seja, isoladores, gaiolas metabólicas, temperatura, período de luz e escuro, antes de iniciar o experimento. A água e a dieta foram oferecidas *ad libitum*. Uma vez por semana a água era repostada e três vezes por semana a dieta, após era realizado o registro do consumo de cada grupo. O local foi mantido a temperatura de 22°C (\pm 3°C), tendo ainda um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro [8].

Os 32 camundongos fêmeas foram submetidos a 4 tratamentos por um período de 90 dias (toxicidade sub-crônica). No tratamento 1, oito animais receberam dieta balanceada à base de milho convencional. No tratamento 2, oito animais receberam 10% da proteína Cry1Ab (Dipel®) acrescido a dieta. Tratamento 3, oito animais receberam 10 % de milho Bt e no tratamento 4, oito animais receberam 30% de milho Bt na dieta.

2.5 - Pesagem dos animais

Os animais foram pesados no dia 0, aos 30 dias e 60 dias de tratamento e ao final dos 90 dias, sempre no turno da manhã. A balança utilizada foi da marca Marte AS1000 com capacidade mínima de 0,5 g e máxima de 1000 g e tarada na bancada de apoio do Biotério Central da UFPel/RS.

2.6 - Consumo alimentar e consumo de água

A ração foi repostada a cada 2 dias em cochinchos com capacidade de 150g. Antes da reposição, os cochinchos eram retirados com cuidado, agrupados conforme o tipo de dieta e colocados em beakers identificados para efetuar posteriormente a pesagem. As rações misturadas às fezes foram pinçadas e pesadas em placas de petri já identificadas. Sobras de dietas dentro da gaiola, caídas na malha ou na bandeja de apoio foram pesadas a fim de se realizar o cálculo total da ingesta da dieta.

A água das mamadeiras foi repostada nas gaiolas, independente do consumo. O nível determinado foi de 250 ml. Os bicos das mamadeiras foram verificados para certificar-se que não estavam entupidos ou vazando. Frascos foram utilizados abaixo do bebedouro para a verificação de desperdício.

2.7 - Observação do comportamento animal

Os animais foram observados entre os 30 e 90 dias de tratamento. A duração da observação foi de aproximadamente 30 minutos para a determinação do nível operante (Tabela 2). Os dados foram obtidos a partir de 3 repetições, e os comportamentos foram registrados em intervalos de 1 minuto. Assim o produto final foi de respostas por minuto [7, 19].

Tabela 2. Comportamentos observados pelos animais para determinação do nível operante.

Sigla	Comportamentos
L	Comportamento de limpeza (coçar-se, lamber-se).
A	Andar
P	Parado ou dormindo
F	Farejar a barra, bebedouro, a grade...
E	Erguer-se nas patas traseiras
B	Bebendo
C	Comendo
R	Brincando na grade ou barra

Este exercício consiste na observação de um comportamento específico do sujeito experimental e o seu propósito é determinar possíveis efeitos de um produto no comportamento animal.

2.8 - Análise estatística

As variáveis passíveis de quantificação foram analisadas estatisticamente por análise de variância com medidas repetidas com comparação entre médias de acordo com Teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Statistix 8 for windows.

Para obter dados estatísticos do comportamento animal foi realizada a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis Test ($p < 0,05$).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Composição proximal das dietas avaliadas

Na Tabela 3, estão expressos os valores médios dos nutrientes em cada dieta. Ao analisar-se estes dados, observa-se que são isoproteicas e isolipídicas, e adequadas para as necessidades diárias dos camundongos. A adição de milho transgênico e da proteína não alterou a composição química da dieta.

Tabela 3. Composição proximal das diferentes dietas avaliadas.

Componente (g/100g)	Dietas			
	Controle	Cry 1Ab**	10%	30%
Umidade e substâncias voláteis a 105°C	9,25	9,85	10,34	9,19
Cinzas	2,70	3,10	2,71	2,76
Fibra bruta	0,47	0,47	0,50	0,51
Gordura	6,39	5,99	6,48	6,46
Proteína (N X 6,25)	9,35	9,88	9,22	9,37
Carboidrato por diferença	71,84	70,71	70,75	71,71

*dados obtidos a partir de 2 repetições

**Proteína obtida através do produto Dipel®

3.2 – Resposta do consumo, ganho de peso e eficácia alimentar entre os tratamentos

Parâmetros nutricionais são importantes quando se quer avaliar a qualidade da proteína utilizada na dieta dos animais [18]. Conforme a Tabela 4, o peso médio inicial dos animais não apresentou diferença estatística, parâmetro importante que demonstra homogeneidade do grupo.

Os grupos apresentaram diferença estatística significativa quanto ao ganho de peso (Tabela 4). O grupo controle foi o que menos ganhou peso durante o tratamento, porém o consumo de água e alimentos não apresentou diferença

estatística. Este dado pode ser relacionado com a atividade do animal, conforme descrito na Tabela 5. Assim, no grupo com 10% de milho Bt o ganho de peso foi maior, porém indiretamente proporcional à atividade e consumo alimentar e de água.

Parâmetros de peso corporal e eficácia alimentar já foram estudados por Chen et al [3], usando ratos alimentados com algodão com a endotoxina Bt por 28 dias, e seus resultados não apresentaram diferença estatística. Outros estudos com produtos transgênicos obtidos através da inserção de gene na soja, são citados na literatura, porém com milho evento Cry1Ab (BTK) não se tem conhecimento.

Um dado importante, quando se trata de ração animal, é a eficácia alimentar. Os camundongos BALB/c que consumiram menos quantidade de dieta obtiveram maior ganho de peso (10% e 30% de milho Bt) conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4: Peso médio, ganho de peso e eficácia alimentar entre os tratamentos.

Parâmetros	Controle	Cry 1Ab	10%	30%
Peso médio (g)	23,59 ± 0,35 ^A	21,96 ± 0,47 ^A	24,13 ± 0,75 ^A	23,77 ± 0,63 ^A
Consumo de água (ml/animal/mês)	114,2 ± 8,27 ^A	123,15 ± 8,55 ^A	123,9 ± 11,09 ^A	109,5 ± 10,37 ^A
Consumo alimentar (g/animal/mês)	145,9 ± 2,16 ^A	148,52 ± 3,95 ^A	127,09 ± 0,54 ^A	129,3 ± 1,44 ^A
Ganho de peso (g)	1,21 ± 0,32 ^C	3,85 ± 0,77 ^B	5,67 ± 0,8 ^A	4,60 ± 0,73 ^{AB}
Eficácia alimentar	0,82 ± 0,22 ^C	2,69 ± 0,58 ^B	4,46 ± 0,63 ^A	3,52 ± 0,53 ^{AB}

Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey HSD.

Eficácia alimentar: ganho de peso médio/consumo alimentarX100

3.3 – Influência do comportamento no ganho de peso do animal

A análise do comportamento animal permite observar a influência da atividade dos animais no ganho de peso. Conforme a Tabela 5, o grupo controle teve maior número de respostas/minuto nos comportamentos de brincar, erguer-se e farejar. O grupo que consumiu a proteína Cry1Ab também apresentou maior respostas/minuto nos comportamentos de andar, farejar e brincar. A diferença no comportamento do animal pode estar relacionado ao seu ganho de peso ou o comportamento pode ter influenciado o ganho de peso e a eficácia alimentar. O consumo alimentar dos animais com 10% e 30% milho Bt acrescidos à ração foram menor que o grupo controle, e o seu ganho de peso foi maior e a média de atividade respostas/minuto menor.

Tabela 5: Média de respostas/minuto do comportamento animal em cada dieta

Parâmetros	DIETAS			
	Controle	Cry1Ab*	10%	30%
Comer	15 ^B	6,5 ^A	8,62 ^A	6,5 ^A
Limpeza	14,75 ^A	17,38 ^A	17,88 ^A	15,5 ^A
Andar	6 ^A	21,83 ^B	4,75 ^A	7,14 ^A
Parado	12,4 ^A	12,63 ^A	11,63 ^B	14,43 ^A
Farejar	25,87 ^B	24 ^B	18 ^{AB}	12,88 ^A
Erguer	12,71 ^B	8,86 ^A	7,25 ^A	3,29 ^A
Brincar	28,43 ^B	16,33 ^{AB}	5 ^A	8,25 ^A
Beber	2,67 ^A	2,5 ^A	1,25 ^A	3 ^A

*Proteína endógena Cry1Ab , usada na pulverização de plantações com o nome comercial de Dispel®
 Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05) pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

4- CONCLUSÃO

Camundongos da linhagem BALB/c foram alimentados com diferentes concentrações de milho Bt, e com a proteína Cry 1Ab, por 90 dias, caracterizando estudo de toxicidade subcrônica. O ganho de peso do grupo controle foi menor que os grupos que receberam milho Bt e proteína Cry 1Ab. Além disso, este grupo consumiu mais ração em relação aos tratamentos citados. Em consequência destes resultados, a eficácia alimentar do grupo controle foi menor em relação aos outros grupos. A melhor eficácia alimentar foi dos grupos 10% e 30% de milho Bt contido na dieta. No parâmetro comportamento animal, foi observado maior resposta/minuto nas observações de erguer, brincar e farejar do grupo controle e grupo Cry1Ab. Com estes dados pode-se inferir que o consumo de milho Bt influenciou o ganho de peso e o comportamento animal.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] 2-TI0%ER Transgenic bioassay studied to improve carcinogenesis testing. **Resear. Anim. Rev.**, v.1, n.4, p.1-2, 2000. Disponível em: <www.taconic.com/newsletters/march97/march97a.htm>. Acesso em: 15 dez. 2004.
- [2] BRASILEIRO, A. C. M., CARNEIRO, V. T. C. Manual de Transformação Genética de Plantas. **Embrapa, Serviço de Produção de Informação – SPI**, p. 163-167, 1998.
- [3] CHEN, S., HUANG, J., ZHOU, B. et al. A safety assessment of feeding rats and quails with cotton-seed meal from Bt-transgenic cotton plants. **J. Agriculture Science**, 12, p.17-22, 1996.
- [4] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC), 2003. Codex AD HOC Intergovernmental task force on foods derived from Biotechnology. Matters referred to the task force by other Codex committees. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp Acesso em: 18 janeiro, 2006.
- [5] COSTA, N. M. B., BORÉM, A. **Biotecnologia e Nutrição: saiba como o DNA pode enriquecer os alimentos**. Ed. Nobel, São Paulo, 2003.
- [6] CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança). Instrução Normativa nº20, de 11.12.2001. In: on-line. Dispõe sobre as normas para avaliação da segurança alimentar de plantas geneticamente modificadas ou de suas partes

e dá outras providências. Disponível em: <http://www.ctnbio.org.br/legislação>
Acesso em: 05 janeiro 2006.

- [7] GOMIDE, P. I. C., WEBER, I. N. D. Análise Experimental do Comportamento - Manual de Laboratório. Ed. UFPR, Curitiba, PR, 5ªed, 1998.
- [8] HAMMOND, B., DUDEK, R., LEMEN, J., NEMETH, M. Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1003-1014, 2004.
- [9] HERMAN, R., PHILLIPS, A., COLLINS, R., TAGLIANI, L. Compositional Equivalency of Cry1F Corn Event TC6275 and Conventional Corn (*Zea mays* L.). **J. Agricultural and Food chemistry**, v. 52, p. 2726-2734, 2004.
- [10] KÖNIG, A., COCKBURN, A., CREVEL, R. W. R., DEBRUYNE, E., et al. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. **Food and Chemical Toxicology**, 42, p.1047-1088, 2004.
- [11] KOUGH, J.; WATSON, M.T. Environmental fate and effects risk assessment. **Bt plant-pestic. Biopestic. Registrat. action doc.** U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division. p. 1-14, 1999.
- [12] KUIPER, A. H., KLETER, A.G., NOTEBORN, H. P. J. M., KOK, E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified food. **The Plant Journal**, 27, p.503-528, 2001.
- [13] LAJOLO, F.M., NUTTI, M.R. **Transgênicos: bases científicas da sua segurança.** São Paulo, SP. SBAN, 112p., 2003.
- [14] ODA, L.M. Alimentos transgênicos: Risco à saúde. In: Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. CTNBio. **Transgênicos.** Brasília, 1999.
- [15] PRESCOTT, C.V.; BUCKLE, A.P. Blood-clotting response tests for resistance to diphacinone and chlorphacinone in the Norway rat (*Rattus norvegicus* berk). **Crop Protec.** v.19, p. 291-296, 2000.
- [16] REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.** v. 123, n. 10, p. 939-1951, 1993.
- [17] ROWLAND, I. R. Genetically modified foods, science, consumer and the media. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.61, p. 25-29, 2002.
- [18] SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição:** fator de saúde e desenvolvimento. Campinas: UNICAMP, 1987.

- [19] SKINNER, B. F. **Ciência e comportamento humano**. Martins Fontes Editora LTDA, São Paulo, SP, 7ª ed., 1989.
- [20] WAL, J.M. Évaluation de l'innocuité des aliments issus d'organismes génétiquement modifiés revue. **Fr. Allergol**, v.37, p.326-333, 1997.
- [21] ZHANG, H.; WANWIMOLRUK, S.; COVILLE, P.F.; SCHOFIELD, J.C.; WILLIAMS, G.; HAINES, S.R.; SUTTIE, J.M. Toxicological evaluation of New Zealand deer velvet powder. Part I: acute and subchronic oral toxicity studies in rats. **Food and Chem. Toxicol.** v.38, p. 985-990, 2000.

ARTIGO 3

“Avaliação hematológica, bioquímica e histopatológica do efeito do milho geneticamente modificado e da proteína cry1Ab na dieta de camundongos”

Artigo escrito conforme as normas de submissão de trabalhos da revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, SP.

AValiação Hematológica, Bioquímica e Histopatológica do Efeito do Milho Geneticamente Modificado e da Proteína Cry1Ab na Dieta de Camundongos

Janaína Guimarães VENZKE¹*, Andréa Ramos ROCHA¹, Vinicius Coitinho TABELÃO², Márcia Feltrin DIAS³, Cristina Geveln FERNANDES³, Leonor Almeida de Souza SOARES⁴.

¹Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas/RS. Campus Universitário, s/nº, Caixa Postal, 234, Pelotas/RS, Brasil. E-mail: Janaína_venzke@ufpel.edu.br

²Mestrado em Clínica Veterinária - Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas/RS, Brasil. E-mail: tabeleao@terra.com.br

³Departamento de Patologia Animal – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas/RS, Brasil. E-mail: crisgevf@ufpel.edu.br

⁴Biotério Central, UFPEL e Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – Fundação Universidade Federal do Rio Grande/RS, Brasil. E-mail: lassoares@brturbo.com.br

*A quem a correspondência deve ser enviada.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a segurança alimentar de produtos transgênicos foi realizado um estudo de 90 dias utilizando 32 camundongos BALB/c com idade entre 6 a 8 semanas, em que foi utilizado milho geneticamente modificado através da inserção de um gene, a Cry1Ab, inseticida para lepidópteros. Os animais foram alocados em 4 grupos de 8 que receberam dieta controle (0%), dietas contendo 10% de milho transgênico (10%), e 30% de milho transgênico (30%) e a endotoxina da Cry1Ab, usada comercialmente na pulverização das lavouras (Cry1Ab). Os resultados hematológicos não apresentaram alterações. Os dados bioquímicos e histopatológicos indicam que houve lesão hepática nos camundongos alimentados com a dieta contendo proteína Cry1Ab, 10% e 30% de milho geneticamente modificado quando comparados com os do grupo controle.

Palavras chaves: proteína Cry1Ab, segurança alimentar, transgênicos, milho Bt.

ABSTRACT

Hematological, biochemical and histo-pathological evaluation of the transgenic corn and Cry1Ab protein effect on mice diet.

In order to developing a methodology evaluating the alimentary security of transgenic products, it has been done a ninety-days study using thirty-two BALB/c mice aging 6 to 8 weeks, where transgenic with Cry1Ab, an insecticide protein against Lepidoptera bugs was used. The animals were divided in four groups of eight; and received control diet (0%), 10%transgenic corn diets (10%), 30% transgenic corn diets (30%), and the endotoxin from Cry1Ab, commercially used for spraying the crops (Cry1Ab). The hematological results did not presented alterations. The biochemical and histo-pathological data indicate that has been hepatic injuries in the mice fed with the Cry1Ab protein, 10% and 30% transgenic corn diets, when compared with the control groups.

Keywords: food safety, transgenic, Cry1ab, nutritional assessment

1.INTRODUÇÃO

Uma das maiores preocupações dos consumidores em relação aos transgênicos e tecnologias relacionadas é que nem todos os riscos tenham sido avaliados. A utilização da tecnologia do DNA recombinante constitui uma nova e fundamental ferramenta para o contínuo desenvolvimento de sistemas agrícolas e produção de alimentos. Apesar da adoção desta tecnologia nos Estados Unidos da América, China, Argentina e partes da África, uma variedade de fatores tem sido questionada em diferentes países. As duas principais questões incluem: a segurança dos produtos derivados para consumo humano e o potencial impacto negativo sobre o meio ambiente [17]. De um lado, pesquisadores admitem a equivalência substancial (comparação bromatológica e nutricional com o análogo convencional) para avaliar a segurança alimentar dos produtos geneticamente modificados, de outro, a preocupação de investigar se a transferência de genes produz proteínas similares, mas com diferenças mínimas, que têm efeitos nos organismos vivos muito distintos das proteínas originais [18].

Conforme prevê a Instrução Normativa nº20 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança [CTNBIO, 2001], e as recomendações da FAO/OMS (2005), são necessárias metodologias de avaliação da segurança dos alimentos desenvolvidos a partir da biotecnologia, para que os mesmos possam ser avaliados caso a caso [10]. Determinações da biodisponibilidade, como: depleção/repleção realizada em animais de laboratório, técnicas *in vitro*, análises da composição química, uso da bioinformática, têm sido utilizados por agências de regulamentação, em países onde o uso de transgênicos foi aprovado para cultivo comercial [17].

O gene *cry1Ab* foi produzido baseado em um cristal protéico do *Bacillus thuringiensis* variedade *kurstaki* (Btk). Esse gene sintetiza a proteína Cry 1Ab, contendo porções de aminoácidos idênticos aos encontrados no organismo em seu ambiente natural, controlando as lagartas da ordem dos Lepidópteros, as mais sérias pragas da cultura do milho. As modificações do gene incluíram mudar seqüências genéticas de DNA, destinadas a realçar a expressão em plantas. As modificações não resultaram em nenhuma mudança de seqüência de aminoácidos na proteína codificada pelo gene [14]. As proteínas do Bt são normalmente encontradas em bactérias do solo, portanto ocasionalmente ingeridas. Além disso, a endotoxina Cry1Ab está disponível comercialmente há mais de 30 anos, com o nome de Dipel®

sendo pulverizada para controle biológico de insetos sem que fossem observados efeitos nocivos ao homem [3]. No entanto, quando um gene exógeno é inserido no DNA da planta, há possibilidade de riscos associados à uma nova proteína [9].

A composição dos alimentos é uma indicação muito significativa do seu valor nutritivo, contudo não é suficiente para uma caracterização completa do ponto de vista nutritivo, isso porque, raríssimos são os nutrientes que contidos nos alimentos, tornam-se totalmente disponíveis ao organismo após a ingestão destes. A porção disponível de qualquer nutriente é aquela que é absorvida em uma forma que possa ser utilizada pelo organismo em seu metabolismo celular. Os fatores que mais interferem na biodisponibilidade dos nutrientes são: digestibilidade, absorção, complexação e presença de substâncias tóxicas[20]. A necessidade de se ter estes dados para orientar a opinião pública, e assegurar o consumo de alimentos geneticamente modificados, baseado na pesquisa científica e para cada evento que será desenvolvido no futuro, inclusive na área de alimentos funcionais, é que se faz necessária metodologia própria para alimentos que serão comercializados no Brasil [15].

Testes comparativos de variedades geneticamente modificadas com variedades convencionais servem como referência para assegurar o consumo dos alimentos geneticamente modificados [7]. Embora a análise comparativa da composição química do milho Bt o abstém de efeitos pleiotrópicos, estudos com animais por 90 dias são empregados para garantir a segurança nutricional do consumo humano [7].

Este estudo foi realizado com o objetivo de buscar avaliar a segurança alimentar de milho modificado geneticamente com a inserção do *gene cry1Ab* do *Bacillus thuringiensis*, avaliando a toxicidade subcrônica de 90 dias [10], analisando dados bioquímicos, hematológicos e histopatológicos em animais de laboratório.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Origem do material

O milho transgênico usado para a pesquisa e seu análogo, originou-se da empresa Sementes Monsanto Ltda., e foi obtido através de parceria do Centro de

Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e Instituto CENA da Universidade de São Paulo (USP).

2.2 – Animais

Foram utilizados 32 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idade entre 6 a 8 semanas provenientes do Biotério Central da Fundação Estadual de Ensino e Pesquisa em Saúde (FEEPS), Porto Alegre/RS.

2.3 - Preparo das dietas

Foram preparados quatro tipos de dietas: Dieta controle (sem adição de milho transgênico), Dieta Cry1Ab (contendo 10% do produto comercial Dispel® utilizado na pulverização das plantações), Dieta 10% (contendo esta quantidade de milho transgênico) e Dieta 30% (contendo esta quantidade de milho transgênico à dieta), conforme as recomendações de HERMAN et al. [8]. A quantidade de milho transgênico e a endotoxina da Cry1Ab, foram calculadas estimando a quantidade de milho utilizado diariamente na dieta de humanos [10, 19, 11, 7]. As dietas foram confeccionadas semanalmente, no Laboratório de Processamento de Alimentos do Departamento de Química de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), e oferecidas diariamente aos animais, em quantidade suficiente para garantir o consumo *ad libitum*. Os teores de vitaminas, sais minerais, fibras e demais nutrientes foram equilibrados segundo as recomendações da AIN 93 para roedores [17] e submetidas à análise de composição proximal no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Química de Alimentos UFPel/RS. A composição das dietas experimentais está indicada na Tabela 1.

Tabela 1. Formulação básica das dietas (g/Kg).

Ingredientes	Dietas (g)			
	controle	Cry1Ab	10%	30%
Farinha de milho não transgênico	400	360	360	280
Farinha de milho transgênico	-	-	40	120
Amido de milho	120	120	120	120
Caseína	100	100	100	100
Malto Dextrina	112	112	112	112
Sacarose	100	100	100	100
Celulose microcristalina	50	50	50	50
L-cistina	3	3	3	3
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Mistura de minerais *	35	35	35	35
Mistura de vitaminas *	10	10	10	10
Óleo de soja (ml)	70	70	70	70
Endotoxina Cry1Ab (Dispel®)	-	40	-	-

* De acordo com AIN 93.

2.4- Ensaio biológico

Os camundongos fêmeas da linhagem BALB/c foram criados em isoladores, em grupos de 4 animais acomodados em oito gaiolas metabólicas, nas dependências do Biotério Central da UFPel/RS. Os camundongos tiveram uma semana para adaptação às condições de criação, ou seja, isoladores, gaiolas metabólicas, temperatura, período de luz e escuro e ração de laboratório, antes de iniciar o experimento. A água e a dieta foram oferecidas *ad libitum*. O local foi mantido a temperatura de 22°C (\pm 3°C), tendo ainda um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro [7].

Os 32 camundongos fêmeas foram submetidos aos 4 tratamentos por um período de 90 dias (toxicidade subcrônica) [10]. Tratamento 1 dieta balanceada à base de milho não transgênico (controle). Tratamento 2, dieta contendo 10% da endotoxina Cry1Ab. Tratamento 3, dieta contendo 10 % de milho transgênico e no tratamento 4, 30% de milho transgênico na dieta.

2.5 - Coleta de sangue para análises hematológica e bioquímica

O sangue foi coletado através da punção do plexo retro-orbital nos dias 0, 30, 60 e 90. O sangue foi coletado em tubos de 2 ml heparinizados para as análises hematológicas de séries vermelhas (eritograma) e branca (leucograma). No eritograma foi realizada a contagem de plaquetas e de hemácias, a determinação do hematócrito, da hemoglobina, do volume corpuscular médio, da hemoglobina corpuscular média, e da concentração da hemoglobina corpuscular média. No leucograma contaram-se os leucócitos e fez-se a contagem da diferenciação celular (linfócitos, monócitos e granulócitos). Essas determinações foram realizadas no analisador ABX Micros 60®.

O sangue para as determinações bioquímicas foi coletado em tubos de 2000µl, colocados em banho-maria à temperatura de 36°C por 1 hora e centrifugados em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415C por 10 minutos, a 3.500 rpm, obtendo-se, assim, o soro. As análises bioquímicas constaram da dosagem de fosfatase alcalina, creatinina, uréia, transaminase glutâmica-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP). As dosagens foram determinadas em Express plus® Bayer.

2.6 - Coleta da urina e análise

A coleta da urina foi realizada nos dias 0, 30, 60 e 90 de tratamento, em frasco próprio esterilizado. Foi determinado através de *pool* para cada gaiola, com 4 animais. Após, fitas de reagente foram imersas na urina, revelando o resultado dos testes por modificação de cor. As tiras de reagente utilizadas foram da marca URI-TEST 10 INLAB Diagnóstica®.

2.7 – Avaliação histopatológica

Após os 90 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical e realizado o dessecamento dos órgãos. Coração, fígado, rim, estômago, intestino, baço e pâncreas foram pesados e preservados em solução neutra de 10% de formol [13]. As lâminas foram preparadas e avaliadas pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFPel/RS.

2.8 - Análise estatística

As variáveis passíveis de quantificação foram analisadas estatisticamente por análise de variância com medidas repetidas com comparação entre médias de acordo com Teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Statistix 8 for windows. As variáveis da urina: ácido ascórbico, bilirrubina, cetonas, glicose, nitritos, pH, proteínas, sangue e urobilogenio foram agrupadas em duas classes, sendo elas fisiológicas e alteradas, conforme tabela 2, desta forma permitindo análise categórica pelo teste de *Fischer Exact*.

Tabela 2. Categorização das variáveis qualitativas da urina.

Parâmetros	Fisiológico	Alterações		
Ácido ascórbico	Negativo	Positivo		
Bilirrubina	Negativo	+	++	+++
Cetonas	Negativo	Positivo		
Glucose	Negativo ou Normal	5	50	150
Nitritos	Negativo	Positivo		
PH	$\leq 7,0$	$> 7,0$		
Proteínas	30 100	500		
Sangue	Negativo	Ca 5-10	Ca 50	Ca 250
Urobilogenio	Negativo ou Normal	Positivo		

Ca contagem analisada

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o estudo de 90 dias com 32 animais, houve a perda de um, aos 60 dias do grupo Cry 1Ab. A causa *mortis* não foi associada ao tratamento. A necropsia não apresentou causa aparente e os tecidos não evidenciaram alterações.

3.1 - Composição proximal das dietas avaliadas

Na Tabela 3, estão expressos os valores médios dos nutrientes em cada dieta. Ao analisar-se esta tabela, observa-se que são isoproteicas e isolipídicas, e adequadas para as necessidades diárias dos roedores [17]. A adição de milho transgênico e da proteína não alterou a composição química da dieta.

Tabela 3. Composição proximal das diferentes dietas avaliadas.

Componente (g/100g)	Dietas			
	Controle	Cry 1Ab	10%	30%
Umidade e substâncias voláteis a 105°C	9,25	9,85	10,34	9,19
Cinzas	2,70	3,10	2,71	2,76
Fibra bruta	0,47	0,47	0,50	0,51
Gordura	6,39	5,99	6,48	6,46
Proteína (N X 6,25)	9,35	9,88	9,22	9,37
Carboidrato por diferença	71,84	70,71	70,75	71,71

* dados obtidos a partir de 2 repetições

3.2 - Análises hematológicas e bioquímicas

Na Tabela 4 estão listadas as médias das análises hematológicas e bioquímicas nos tratamentos com as dietas. As dosagens hematológicas são exames laboratoriais de rotina para avaliação quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue. Pode sofrer alterações de significação diagnóstica não apenas nas doenças hematológicas, mas também em doenças das mais variadas patologias [5]. As dosagens bioquímicas têm imensa importância clínica, pelo fato de que as alterações em suas atividades fornecem indicadores sensíveis de lesão ou proliferação celular [12].

Tabela 4. Análises hematológicas e bioquímicas entre os 4 tratamentos (\pm erro padrão da média).

Análises hematológicas e bioquímicas	n	0% Média	Cry1Ab Média	10% Média	30% Média
Contagem de leucócitos (WBC)	31-32	1,76 \pm 0,08 ^A	1,61 \pm 0,088 ^A	1,57 \pm 0,085 ^A	1,46 \pm 0,085 ^A
Contagem de eritrócitos (RBC)	31-32	4,29 \pm 0,19 ^A	4,07 \pm 0,15 ^A	4,18 \pm 0,099 ^A	3,80 \pm 0,17 ^A
Dosagem de Hemoglobina(HGB)	31-32	8,76 \pm 0,33 ^A	8,62 \pm 0,39 ^A	8,96 \pm 0,42 ^A	9,38 \pm 0,74 ^A
Hematócrito (HCT)	31-32	26,53 \pm 1,45 ^A	25,08 \pm 1,72 ^A	25,68 \pm 1,53 ^A	24,18 \pm 1,56 ^A
Plaquetas (PLT)	31-32	422,28 \pm 15,8 ^A	412,25 \pm 23,5 ^A	422,65 \pm 19,25 ^A	400,78 \pm 17,36 ^A
Contagem de plaquetas (PCT)	31-32	367,50 \pm 25,20 ^A	335,69 \pm 22,5 ^A	386 \pm 30,49 ^A	327,09 \pm 19,66 ^A
Volume Corpuscular Médio (MCV)	31-32	47,32 \pm 0,34 ^A	48,06 \pm 0,35 ^A	48,42 \pm 0,47 ^A	48,50 \pm 0,27 ^A
Hemoglobina Corpuscular Média (MCH)	31-32	17,1 \pm 0,31 ^A	17,35 \pm 0,26 ^A	17,45 \pm 0,26 ^A	17,27 \pm 0,23 ^A
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC)	31-32	36,02 \pm 0,78 ^A	35,99 \pm 0,52 ^A	36,3 \pm 0,34 ^A	35,64 \pm 0,40 ^A
% de Linfócitos (LIM)	24-25	82,14 \pm 1,96 ^A	84,56 \pm 1,80 ^A	86,77 \pm 0,99 ^A	82,92 \pm 3,31 ^A
% de Monócitos (MON)	24-25	14,37 \pm 1,72 ^A	13,66 \pm 1,61 ^A	11,29 \pm 0,86 ^A	11,70 \pm 0,79 ^A
% de Granulócitos (GRA)	24-25	3,52 \pm 0,58 ^A	1,79 \pm 0,30 ^A	1,96 \pm 0,44 ^A	1,86 \pm 0,29 ^A
Fosfatase Alcalina	31-32	82,87 \pm 8,12 ^A	72,5 \pm 6,18 ^A	85,1 \pm 4,27 ^A	99,44 \pm 7,58 ^A
Creatinina	31-32	0,24 \pm 0,015 ^A	0,24 \pm 0,018 ^A	0,269 \pm 0,021 ^A	0,290 \pm 0,033 ^A
Uréia	31-32	54,97 \pm 1,77 ^A	59,16 \pm 1,88 ^A	55,71 \pm 1,75 ^A	56,88 \pm 1,69 ^A
Transaminase glutâmica-oxalacética (TGO)	31-32	158,47 \pm 9,92 ^B	207,34 \pm 17,3 ^A	154,74 \pm 6,97 ^B	152,25 \pm 7,19 ^B
Transaminase glutâmica pirúvica (TGP)	31-32	112,13 \pm 14,1 ^A	128,91 \pm 12,1 ^A	118,16 \pm 14,52 ^A	109,75 \pm 10,29 ^A

As letras A e B na linha horizontal indicam que houve diferença estatística entre os grupos analisados pelo teste de Tukey HSD(P<0,05)
n- número de animais.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, observa-se que os valores de transaminase glutâmica-oxalacética (TGO) foram estatisticamente diferentes entre os grupos avaliados. O grupo com dieta Cry1Ab foi o que apresentou maior valor (207,34g/dl); não houve diferença estatística entre os grupos alimentados com dieta controle e acrescidos de 10% e 30% de milho transgênico. A TGO é encontrada principalmente na mitocôndria (80%), quando aumentada na circulação indica lesão grave das células hepáticas [12], levando ao diagnóstico de doença hepática.

Os resultados obtidos nas análises hematológicas, não apresentaram diferença estatística entre os grupos. A comparação das respostas com estudos em galinhas e suínos demonstram que o milho Bt não causa alterações. Conforme Flachowsky & Chesson [6], os pesquisadores Chowdhury et al, (2003), investigaram a degradação da proteína Cry 1Ab do milho geneticamente modificado Bt11 no trato digestivo de bezerros e suínos. Eles não encontraram lesões patológicas no trato

digestivo. Suínos são considerados bons modelos para testes de segurança de alimentos, pois possuem sistema digestivo e cardiovascular semelhante aos dos humanos.

3.3 - Análise da urina

A Tabela 5 mostra as distribuições de freqüências (%) das observações realizadas nas avaliações qualitativas da urina, quanto aos parâmetros de ácido ascórbico, bilirrubina, cetonas, glicose, nitritos, pH, proteínas, sangue e urobilogênio.

Tabela 5. Distribuição de freqüência (%) das ocorrências dos parâmetros qualitativos da urina.

Parâmetros	Controle (%)		Cry1Ab (%)		10% (%)		30% (%)	
	F	A	F	A	F	A	F	A
Ácido ascórbico	100,0	0	75,0	25,0	87,5	12,5	100,0	0
Bilirrubina	25,0	75,0	25,0	75,0	12,5	87,5	25,0	75,0
Cetonas	75,0	25,0	87,5	12,5	75,0	25,0	87,5	12,5
Glicose	75,0	25,0	87,5	12,5	75,0	25,0	87,5	12,5
Nitritos	75,0	25,0 ^A	25,0	75,0 ^B	12,5	87,5 ^A	25,0	75,0 ^A
pH	75,0	25,0	87,5	12,5	87,5	12,5	100,0	0
Proteínas	75,0	25,0	50,0	50,0	57,1	42,9	62,5	37,5
Sangue	62,5	37,5	50,0	50,0	62,5	37,5	62,5	37,5
Urobilogênio	100,0	0	100,0	0	100,0	0	100,0	0

F= fisiológico, A= identifica a freqüência de alterações na urina por tratamento.

As letras A e B na linha horizontal indicam que houve diferença estatística entre os grupos analisados pelo teste de Fischer Exact ($P < 0,05$), os dados que não constam letras não foram diferentes estatisticamente.

As freqüências descritas na tabela 5 foram agrupadas em dois grupos das avaliações fisiológicas e alteradas, conforme a Tabela 2.

Durante o período de realização do experimento, os resultados demonstram que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos nos parâmetros de ácido ascórbico, bilirrubina, cetonas, glucose, pH, proteínas, sangue e urobilogênio. Resultados dos nitritos presente na urina indicou maior freqüência ($p < 0,05$) no grupo 10% de milho transgênico em relação ao grupo controle, porém este efeito não foi verificado com as demais comparações entre os tratamentos. Os nitritos na urina são uma prova indireta para o diagnóstico precoce de bacteriúria significativa e assintomática [12]. Este dado pode estar relacionado com infecções do trato renal específico ao grupo e não ao tratamento em estudo.

3.4 - Características histopatológicas

3.4.1. Alterações histopatológicas

Os órgãos coletados foram submetidos a avaliações histopatológicas. Coração, rim, estômago, intestino, baço e pâncreas, em todos os tratamentos, apresentaram ausência de alterações ou sem alteração aparente. O fígado conforme descrito na Tabela 7, apresentou modificações em sua estrutura. Na dieta controle, observou-se apenas 2 animais com degeneração gordurosa aleatória (figura 1) e um discreto aumento de volume no órgão.

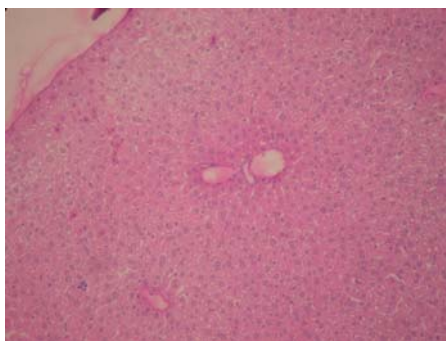


Figura 1: Região portal de animal do grupo controle apresentando hepatócitos com discreta degeneração H-E. Obj. 20X

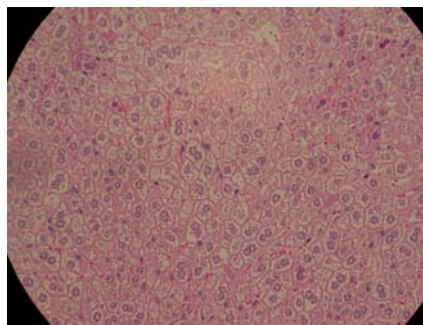


Figura 2: Hepatócito da zona centrilobular do fígado de um animal que consumiu dieta contendo Cry 1Ab, exibindo degeneração, caracterizada pelo aspecto finamente granular do citoplasma dessas células. H.E. Obj. 40X

Os animais alimentados com o a dieta Cry1Ab, tiveram incidência de alterações com acentuado aumento de volume em todos os fígados analisados (figura 2). Em 4 animais, observou-se degeneração gordurosa aleatória com focos difusos de necrose e 2 animais uma degeneração gordurosa difusa. Os animais que consumiram dietas com 10% apresentaram dos 7 fígados avaliados, 4 com moderado ou acentuado aumento do volume e com degeneração gordurosa aleatória e difusa, 3 estavam ausentes de alterações (figura 3 e 4).

No tratamento com 30% de milho transgênico, 4 fígados apresentaram degeneração gordurosa aleatória ou difusa com acentuado aumento de volume do órgão e dois destes com focos difusos de necrose (figura 5).

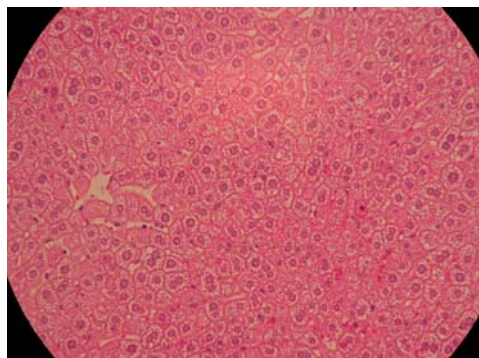


Figura 3: Detalhe do órgão de animal que consumiu dieta com 10% de milho transgênico, onde se observa hepatócito da zona centrotubular exibindo degeneração mais severa. H.E.Obj. 40X

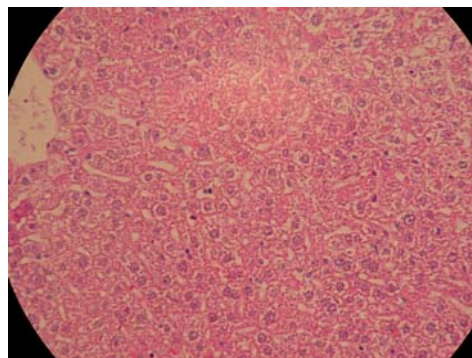


Figura 4: Outro detalhe de fígado de animal que consumiu dieta com 10% de transgênico, com células um pouco menos delineadas, apresentando degeneração severa (sem definir a zona). H.E Obj. 40X

Conforme Flachowsky & Chesson [6], os pesquisadores Chowdhury et al, (2003), investigaram a degradação da proteína Cry 1Ab do milho geneticamente modificado Bt11 no trato digestivo de bezerros e suínos e não encontraram lesões patológicas no mesmo.

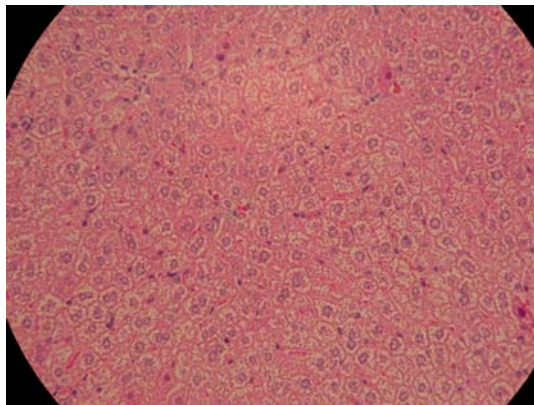


Figura 5: Detalhe de hepatócito de animal que consumiu dieta com 30% de milho transgênico. Sem definir a zona e pontuando que a degeneração é mais severa. As células binucleadas e com grandes núcleos são típicas da espécie, sendo um achado casual.H-E. Obj. 40X

Tabela 7. Incidência microscópica de alterações histopatológicas no fígado dos camundongos entre os tratamentos.

Características	Controle n=7	Cry1Ab n=7	10% n=7	30% n=7
Ausência de alterações	2		3	3
Sem alterações aparentes	3			
Degeneração gordurosa aleatória	2	4	2	2
Degeneração gordurosa discretíssima		1		
Degeneração gordurosa discreta				
Degeneração gordurosa difusa		2	2	3
Focos difusos de necrose		4		2
Discreto aumento de volume do órgão	2			
Moderado aumento de volume do órgão			3	
Acentuado aumento de volume do órgão		7	1	4

Comparando com os resultados dos dados bioquímicos, pode-se confirmar que houve doença hepática no grupo que consumiu dieta acrescida de Cry1Ab. Os grupos com 10% e 30% de milho transgênico apresentaram mais da metade dos órgãos analisados com alterações, porém não confirmados com os dados bioquímicos e com a relação peso do órgão e peso do animal.

No momento da necropsia, os órgãos foram avaliados macroscopicamente, e observou-se que os fígados dos animais que continham 10% e 30% de milho transgênico na dieta apresentavam pouca resistência ao corte e com cor marrom escuro, diferente do grupo controle cujo órgão apresentava-se tenro e com coloração vermelho vivo.

Os dados histopatológicos são importantes, pois permitem conhecer os processos patológicos gerais e correlacionar as imagens com os aspectos clínicos desses processos. No estudo realizado, os dados histopatológicos demonstram alterações hepáticas graves nos tratamentos com proteína e milho transgênico, porém pouco correlaciona com os dados bioquímicos e hematológicos, sugerindo continuidade ao estudo.

3.4.2 Relação do peso do fígado com o peso animal

Para se buscar mais informações das alterações apresentadas no estudo histopatológico do fígado do animal e nas análises bioquímicas apresentadas, foi realizado o cálculo do peso do fígado com o peso animal. Conforme apresentado na

Tabela 8, os resultados demonstram que não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 8: Relação do peso médio do fígado com o peso médio do animal em jejum.

Parâmetro	Controle (%)	Cry 1Ab (%)	10% (%)	30% (%)
Relação Peso do fígado e peso do animal	4,3 ± 0,07 ^A	4,36 ± 0,05 _A	4,01 ± 0,19 _A	4,07 ± 0,09 _A

Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística ($P<0,05$) pelo teste de Tukey HSD.

O peso do órgão foi proporcional ao peso do animal, comparado com o grupo controle. Mesmo o órgão apresentando aumento no volume, não foi estatisticamente diferente entre os grupos avaliados. Esse dado não possibilitou correlacionar as imagens com processos patológicos no órgão.

4- CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados obtidos, pode-se concluir que o acréscimo da proteína Cry1Ab, tanto em pó como é comercializado para pulverizar as lavouras, como o presente no milho que sofreu transformação genética, mesmo em concentração alta de 30%, não apresentou diferenças nos níveis hematológicos. No entanto, dados bioquímicos demonstram lesão hepática nos camundongos alimentados com a dieta contendo a proteína Cry1Ab, e as análises histopatológicas dos órgãos dos camundongos com dietas contendo a proteína demonstram degenerações, necroses e aumento de volume do órgão, sugerindo a importância da continuação das investigações sobre o tema.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]BRASILEIRO, A. C. M., CARNEIRO, V. T. C. Manual de Transformação Genética de Plantas. **Embrapa, Serviço de Produção de Informação – SPI**, p. 163-167, 1998.
- [2]CODEX ALIMENTARIUS. Código de segurança internacional no uso de alimentos. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp Acesso em: 18 janeiro, 2006.
- [3]COSTA, N. M. B., BORÉM, A. **Biotecnologia e Nutrição: saiba como o DNA pode enriquecer os alimentos**. Ed. Nobel, São Paulo, 2003.
- [4]CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança). Instrução Normativa nº20, de 11.12.2001. In: on-line. Dispõe sobre as normas para avaliação da segurança alimentar de plantas geneticamente modificadas ou de suas partes e dá outras providências. Disponível em: <http://www.ctnbio.org.br/legislação> Acesso em: 05 janeiro,2006.
- [5]FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**, 3ª. edição. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.
- [6]FLACHOWSY, G. CHESSON,A. Fornecimento de Plantas Geneticamente Modificadas em Nutrição Animal. **Waap Book of the year**, p.41-267, 2003.
- [7]HAMMOND, B., DUDEK, R., LEMEN, J., NEMETH, M. Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1003-1014, 2004.
- [8]HERMAN, R., PHILLIPS, A., COLLINS, R., TAGLIANI, L. Compositional Equivalency of Cry1F Corn Event TC6275 abd Conventional Corn (Zea mays L.). **J. Agricultural and Food chemistry**, v. 52, p. 2726-2734, 2004.
- [9]HOFTE, H., WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of Bacillus thuringiensis. **Microbiol. Rev.** v.53, p.242-255, 1989.
- [10]KÖNIG, A., COCKBURN, A., CREVEL, R. W. R., DEBRUYNE, E., et al. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. **Food and Chemical Toxicology**, 42, p.1047-1088, 2004.
- [11]KUIPER, A. H., KLETER, A.G., NOTEBORN, H. P. J. M., KOK,E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified food. **The Plant Journal**, 27, p.503-528, 2001.
- [12]MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações**, 4ª. edição. Caxias do Sul: EDUCS, 2003.
- [13]MURALIDHARA, NARASIMHAMURTHY, K., VISWANATHA, S., RAMESH, B. S. Acute and subchronic toxicity assessment of debitterized fenugreek powder in the mouse and rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 831-838, 1999.

- [14]NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* inseticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Protec.** V. 19, p. 669-676, 2000.
- [15]ODA, L. M. Alimentos transgênicos: Risco à saúde. In: Brasil. **Ministério da Ciência e Tecnologia. CTNBio.** Brasília, 1999.
- [16]RECH, Elíbio Leopoldo. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. In: on-line. Estudos de segurança alimentar e ambiental de plantas transgênicas contendo características de interesse agrícola. Brasília, 2006. Disponível em: <http://www.cib.org.br> Acesso em: 7 jan. 2006.
- [17]REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.** v. 123, n. 10, p. 939-1951, 1993.
- [18]RIBEIRO, S. Grupo ETC. Ameaça para os bebês. Disponível em: <http://www.> Acesso em: 12 de fever. 2006.
- [19]ROWLAND, I. R. Genetically modified foods, science, consumer and the media. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.61, p. 25-29, 2002.
- [20]SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição:** fator de saúde e desenvolvimento. Campinas: UNICAMP, 1987.
- [21]WATANABE, E., NUTTI, M. R. Alimentos Geneticamente Modificados: Avaliação de Segurança e Melhorias de Qualidade em Desenvolvimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n.1, p. 1-14, 2002.
- [22]WHO,2002. Legislação para recomendações de produtos derivados da biotecnologia. Disponível em:<http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/20questions/en/index.html>. Acesso em: 20 janeiro 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

O ganho de peso do grupo controle foi estatisticamente menor do que o dos grupos que receberam milho Bt e a proteína Cry1Ab, e quanto ao consumo alimentar não teve diferença estatística, entre os mesmos.

A eficácia alimentar do grupo controle foi estatisticamente menor em relação ao dos outros grupos.

Grupo controle e grupo Cry1Ab tiveram maior respostas/minuto em observações de erguer, brincar e farejar, caracterizando maior atividade.

Parâmetros hematológicos e de urina não tiveram diferença estatística entre os grupos. As dosagens bioquímicas de transaminase-glutâmica oxalacética (TGO), indicam lesão hepática na dieta contendo a proteína Cry1Ab.

Camundongos com dietas contendo a proteína Cry1Ab e as contendo 10 e 30% de milho transgênico, apresentaram hepatócitos com degenerações severas, necroses e aumento de volume do órgão.

Os resultados apresentados neste trabalho evidenciaram alterações hepáticas importantes em camundongos de raça isogênica (BALB/c), mantida sob condições controladas. Sugerem-se investigações mais aprofundadas sobre o assunto.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- BINSFELD, P. C. Análise Diagnóstica de um produto transgênico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, V.2, n.12, p.16-19, 2000.
- BRITISH MEDICAL ASSOCIATION. **The impact of genetic modification on agriculture, food and health**. Londres, 18p, 1999.
- CAVALLI, S. B. Segurança Alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. **Revista de nutrição**, Campinas, v.14, p. 41-46, 2001.
- HAMMOND, B., DUDEK, R., LEMEN, J., NEMETH, M. Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. **Food and Chemical Toxicology**, 42, p. 1003-10014, 2004.
- HOFFMANN, M. A. Preocupações e conseqüências negativas do uso de plantas transgênicas. **Plantio Direto**, Passo fundo, RS, n.51, p.26-28, 1999.
- NEVES, M. F. *et al.* **Alimentos novos tempos e conceitos na gestão de negócios**. São Paulo: Pioneira, 2000.
- NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar. In: **Simpósio Sul-Brasileiro de Alimentação e Nutrição: História, Ciência e Arte**. Florianópolis, 2000.
- NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impacto, riscos e segurança alimentar (Biossegurança de plantas transgênicas). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, p. 105-116, 2003.
- SOUZA, M. Mamão transgênico chega ao campo. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.2, n.11, p. 4-7, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)