

MONSANTO



MONSANTO DO BRASIL LTDA

AV. NAÇÕES UNIDAS, 12901
TORRE NORTE - 7 E 8 ANDARES
04578-000 - SÃO PAULO - SP - BRASIL
TEL.: (11) 5503-2600
FAX: (11) 5503-2702

**São Paulo, 13 de agosto de 2007.
REG-566/07**

**Ilmo. Sr.
Dr. Walter Colli
Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio
Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT
Centro de Estudos Estratégicos - CEE
SPO - Área 5 - Quadra 3 - Bloco B - Térreo - Salas 10 a 14
Brasília - DF - 70610-200**

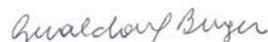
Ref.: Edital de Audiência Pública Nº 02/2007

Prezado Dr. Colli

A CIBio da Monsanto do Brasil Ltda. vem por meio desta fornecer contribuição técnica sobre o processo nº 01200.004487/04-48 que solicita a liberação comercial do algodão MON 1445 (ou algodão Roundup Ready®), a ser apresentado na referida Audiência Pública. Esta contribuição técnica é fornecida na forma do documento **“A biossegurança do algodão geneticamente modificado tolerante ao glifosato MON 1445”**.

Agradecemos a sua atenção e colocamo-nos à disposição para os esclarecimentos que se fizerem necessários.

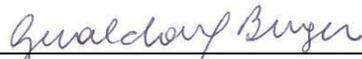
Atenciosamente.


**Geraldo U. Berger
Presidente da CIBio
Monsanto do Brasil Ltda.**

**A BIOSSEGURANÇA DO ALGODÃO GENETICAMENTE
MODIFICADO TOLERANTE AO GLIFOSATO MON 1445
(PROCESSO N° 01200.004487/04-48)**

Monsanto do Brasil Ltda.

São Paulo, 13 de agosto de 2007.



Geraldo Ubirajara Berger, Ph.D.

Presidente da CIBio da Monsanto do Brasil Ltda.

**A BIOSSEGURANÇA DO ALGODÃO GENETICAMENTE MODIFICADO
TOLERANTE AO GLIFOSATO MON 1445**

TABELA DE CONTEÚDO

INTRODUÇÃO	3
1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	4
2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CP4 EPSPS E NPTII	4
3. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS, ESTABILIDADE DO GENÓTIPO E EFICÁCIA.....	6
3.1. Características agronômicas.....	6
3.2. Estabilidade da característica de tolerância ao glifosato.....	7
3.3. Tolerância e eficácia.....	7
4. SEGURANÇA ALIMENTAR	8
4.1. Proteína CP4 EPSPS	9
4.2. Proteína NPTII	10
4.3. Composição nutricional e estudos com animais	12
5. SEGURANÇA AMBIENTAL	13
5.1. Organismos não-alvo	14
5.2. Transferência gênica.....	14
5.3. Potencial do algodão MON 1445 como planta daninha	17
6. BENEFÍCIOS.....	18
7. CONCLUSÕES	20
8. REFERÊNCIAS	20

A BIOSSEGURANÇA DO ALGODÃO GENETICAMENTE MODIFICADO TOLERANTE AO GLIFOSATO MON 1445

INTRODUÇÃO

A Monsanto desenvolveu o algodão MON 1445 com a característica de tolerância ao glifosato, que é o ingrediente ativo dos herbicidas Roundup® (Williams et al., 2000), como mais uma opção para o controle de plantas daninhas na cultura do algodão. O algodão MON 1445 foi produzido através da modificação genética da variedade comercial Coker 312 utilizando a metodologia mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. A transformação inseriu os genes *cp4 epsps*, *nptII* e *aad* no genoma dessa variedade de algodão. As proteínas expressas no algodão MON 1445 são a CP4 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS) proveniente da *Agrobacterium* sp. cepa CP4, que é naturalmente tolerante ao glifosato, e a neomicina fosfotransferase tipo II (NPTII), que confere resistência a antibióticos aminoglicosilados, comumente utilizados em cultura de tecidos de plantas para seleção de transformantes. A proteína 3''(9)-O-aminoglicosídeo adenililtransferase (AAD) não é expressa na planta, pois o gene *aad* está sob o controle de um promotor procariótico.

O controle de plantas daninhas que é realizado pelo glifosato (Malik et al., 1989) ocorre pela inibição das enzimas EPSPS endógenas destas plantas. Essa enzima catalisa uma etapa na via metabólica do ácido chiquímico (Haslam, 1993) que leva a biossíntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) em plantas e microrganismos. A via do ácido chiquímico é também responsável pela biossíntese de metabólitos secundários como o tetrahidrofolato, a ubiquinona e a vitamina K. Embora esta via e também as proteínas EPSPS estejam ausentes em mamíferos, peixes, aves, répteis e insetos, elas são essenciais em plantas (Alibhai e Stallings, 2001). Estima-se que moléculas aromáticas derivadas do ácido chiquímico representam 35% ou mais do peso seco de plantas (Franz et al., 1997).

A enzima CP4 EPSPS produzida no algodão MON 1445 possui baixa afinidade pelo glifosato, se comparada com as proteínas EPSPS selvagens. Assim, quando o algodão MON 1445 é tratado com o herbicida glifosato (Barry et al., 1992), a ação dessa enzima faz com que as plantas continuem se desenvolvendo normalmente. Como os animais não utilizam a via biossintética de aminoácidos aromáticos, o glifosato é considerado um herbicida de baixa toxicidade e seguro para animais e para o meio ambiente.

Todos os estudos de campo, casa-de-vegetação e laboratório realizados com o algodão MON 1445 demonstraram que este evento de transformação genética é tão seguro quanto o algodão convencional com respeito às suas características reprodutivas, agronômicas, de segurança alimentar e ambiental, nutricionais, e outras. O algodão MON 1445 encontra-se aprovado em países como: Estados Unidos (1995), Canadá (1996), Japão (1997), Austrália e Nova Zelândia (2000), Coréia do Sul (2003), África do Sul (2000), México (2000), Filipinas (2003), Argentina (1999), União Européia (2005) e China (2004). Existe, portanto, um histórico de uso seguro do algodão MON 1445 desde 1995, sem que nenhum efeito adverso à saúde humana e animal e ao meio ambiente tenha sido relatado.

1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

O algodão MON 1445 foi obtido a partir da modificação da variedade comercial Coker 312 utilizando o plasmídeo PV-GHGT07, através do sistema de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Esta transformação inseriu os genes *cp4 epsps*, *nptII* e *aad* no genoma da variedade Coker 312 (Serdy e Nida, 1995). Portanto, a linhagem de algodão resultante da transformação, expressa a enzima CP4 EPSPS proveniente da *Agrobacterium* sp. cepa CP4, que é naturalmente tolerante ao glifosato. Essa linhagem expressa também a proteína NPTII, que confere resistência a antibióticos aminoglicosilados, possibilitando a seleção de células vegetais com o gene *cp4 epsps* em um meio de cultura contendo o antibiótico canamicina nas fases *in vitro* do processo de transformação. O terceiro gene introduzido, o *aad*, codifica a proteína AAD e não é expresso em tecido vegetal por estar sob o controle de um promotor procariótico.

O algodão MON 1445 foi caracterizado quanto ao DNA inserido, à expressão das proteínas codificadas pelos genes inseridos, às suas características fenotípicas e ao seu desempenho agrônomo. Adicionalmente, a composição dos produtos da planta foi comparada com contrapartes convencionais. A transformação inseriu os genes *cp4 epsps*, *nptII* e *aad* no genoma do algodão. Essa inserção foi caracterizada através de análises moleculares que utilizaram as técnicas de *Southern blot* (Nida et al., 1996a), PCR (Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction*) e seqüenciamento de nucleotídeos. Essas técnicas permitiram identificar: o número de locais em que o DNA foi inserido; o número de cópias dos genes inseridos; a composição e a integridade dos genes inseridos; a seqüência de nucleotídeos do DNA inserido; e a seqüência de nucleotídeos que flanqueiam o DNA inserido. Em resumo, a caracterização molecular do algodão MON 1445 mostrou que: (1) o DNA do plasmídeo PV-GHGT07 foi inserido em um único local no genoma do algodão; (2) a inserção contém 5.734 pb, composta da seqüência *E9 3'*, da seqüência codificadora do gene *cp4 epsps*, da seqüência codificadora do CTP2, do promotor P-FMV, do gene *aad*, do finalizador *NOS 3'*, da seqüência codificadora do gene *nptII*, do promotor 35S e uma parte da seqüência do elemento *ori-V*; (3) a ligação entre os elementos genéticos e a integridade do DNA inserido foram mantidas durante a inserção (Serdy e Nida, 1995).

A estabilidade genética da seqüência de DNA contida no algodão MON 1445 foi determinada pelo padrão de estabilidade hereditária, pela integridade do DNA inserido e pela estabilidade do fenótipo (expressão e eficácia) em várias condições ambientais determinadas em várias gerações de linhagens obtidas por retrocruzamento com cultivares elite, inclusive uma variedade tropical adaptada para cultivo no Brasil (Nida et al., 1996a). Os resultados que foram obtidos do retrocruzamento são consistentes com a inserção do gene *cp4 epsps* em um único local no genoma do algodão, o qual é segregado de acordo com o padrão de herança mendeliano. As análises moleculares demonstraram que a integridade do gene inserido é mantida durante várias gerações e que a característica é expressa de forma estável em várias condições ambientais.

2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CP4 EPSPS E NPTII

A expressão das proteínas CP4 EPSPS e NPTII foi determinada em vários tecidos e estágios de desenvolvimento do algodão MON 1445 através da técnica de ELISA, validada especificamente para a detecção e quantificação dessas proteínas em extratos de vários tecidos de algodão. Os tecidos do algodão MON 1445 foram obtidos durante experimentos

de campo realizados nos Estados Unidos nas safras de 1993 e 1994, na Espanha na safra de 1997, e no Brasil nas safras de 1999/2000 e 2002/2003.

Os dados coletados nos Estados Unidos durante as safras de 1993 e 1994 mostram que as proteínas CP4 EPSPS e NPTII foram expressas em níveis extremamente baixos, em uma faixa entre 0,02% e 0,028% da proteína total da semente do algodão (Nida et al., 1996a). A média de expressão da proteína CP4 EPSPS em folhas e sementes coletadas em seis locais em 1993 foi, respectivamente, de 0,052 e 0,082µg/mg de tecido fresco. A média de expressão da proteína CP4 EPSPS em sementes coletadas em seis locais em 1994 foi de 0,060µg/mg de tecido fresco (Serdy e Nida, 1995). A média de expressão da proteína NPTII em tecidos de folhas e de sementes coletados em experimentos de campo realizados em 1993 foi, respectivamente, de 0,045 e 0,007µg/mg de tecido fresco. A média de expressão da proteína NPTII em sementes coletadas em 1994 foi de 0,007µg/mg de tecido fresco.

A média de expressão da proteína CP4 EPSPS em folhas e sementes coletadas em dois locais na Espanha na safra de 1997 foi, respectivamente, de 0,053 e 0,105µg/mg de tecido fresco. Já a média de expressão da proteína NPTII em folhas e sementes foi, respectivamente, de 0,021 e 0,0035µg/mg de tecido fresco.

Os níveis de expressão das proteínas CP4 EPSPS e NPTII demonstraram uma variabilidade mínima (menos de 2X) quando as plantas foram cultivadas em diferentes localizações geográficas e condições ambientais. Destaca-se também que, durante a safra de 1993, as plantas não receberam tratamento com o herbicida Roundup®; enquanto que as plantas coletadas durante a safra de 1994 nos Estados Unidos e durante a safra de 1997 na Espanha receberam tratamento com uma dose comercial do herbicida Roundup®. Não foram observadas diferenças significativas no nível de expressão entre plantas tratadas e plantas não tratadas com glifosato.

Os estudos de expressão das proteínas CP4 EPSPS e NPTII no Brasil foram realizados com tecidos de algodão obtidos da linhagem DP50RR (MON 1445) em experimentos de campo realizados durante a safra de 1999/2000 em três locais e durante a safra de 2002/2003 em três locais. Os experimentos de campo representaram as práticas agrônomicas, as condições ambientais e as regiões típicas no cultivo de algodão comercial no Brasil. Durante a safra de 1999/2000 obteve-se dados de expressão em sementes (coletadas durante a colheita) e durante a safra de 2002/2003 obteve-se dados de expressão em folhas no estágio V11 (aproximadamente 50 dias após a emergência) e sementes (coletadas durante a colheita). Os níveis médios das proteínas CP4 EPSPS e NPTII em sementes obtidas dos experimentos de campo realizados em 1999/2000 em todos os locais foram, respectivamente, de 0,184 e 0,019µg/mg de tecido fresco. Os níveis médios das proteínas CP4 EPSPS e NPTII em sementes obtidas dos experimentos de campo realizados em 2002/2003 em todos os locais foram, respectivamente, de 0,170 e 0,007µg/mg de tecido fresco. Os níveis médios das proteínas CP4 EPSPS e NPTII em folhas obtidas dos experimentos de campo realizados em 2002/2003 em todos os locais foram, respectivamente, de 0,070 e 0,018µg/mg de tecido fresco. Os níveis de expressão das proteínas CP4 EPSPS e NPTII observados nesses estudos foram semelhantes àqueles encontrados nos estudos realizados com tecidos produzidos nos experimentos de campo realizados nos Estados Unidos e na Espanha (Serdy e Nida, 1995).

Embora o gene *aad* tenha sido inserido no genoma do algodão, a proteína codificada por ele não é expressa no algodão MON 1445, como demonstrado experimentalmente. As análises utilizaram folhas e/ou sementes do algodão MON 1445 produzidas em experimentos de campo realizados nos Estados Unidos em 1993 e também no Brasil em

1999/2000. A proteína AAD não foi detectada no tecido da folha e tão pouco na semente de algodão MON 1445 (Nida et al., 1996a).

3. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS, ESTABILIDADE DO GENÓTIPO E EFICÁCIA

3.1. Características agronômicas

Com exceção da tolerância ao glifosato, as plantas de algodão MON 1445 demonstraram equivalência ao padrão, representado pela linhagem parental convencional ou outras variedades convencionais, em todas as características fenotípicas e agronômicas avaliadas. Na avaliação das características agronômicas, o algodão MON 1445 foi comparado à linhagem parental convencional Coker 312 ou ao parental recorrente quanto a morfologia, crescimento e desenvolvimento (germinação, vigor da planta, período para florescimento, números de flores por planta, números e tamanho de capulhos), suscetibilidade a pragas e doenças, e rendimento. O algodão MON 1445 se mostrou equivalente à variedade parental coker 312 e outras variedades comerciais em todas as características fenotípicas e agronômicas avaliadas. Em alguns locais, observou-se pequenas diferenças entre algumas linhagens de algodão MON 1445 e linhagens convencionais, como florescimento mais tardio, menor número de frutos e macho-fertilidade. Entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas quando comparadas à média observada no germoplasma do algodão. Aplicações foliares do herbicida Roundup® que não considerem o período (i.e., após a iniciação do botão floral) e a dose recomendados podem aumentar a esterilidade no macho e reduzir o número de maçãs. Aplicações de doses comerciais, dentro do período recomendado, não causam infertilidade ou redução em produtividade (Mery et al., 2002). A qualidade das fibras de variedades comerciais de algodão MON 1445 também foi extensivamente avaliada e não demonstrou nenhum efeito associado à inserção gênica. Dados sobre o comprimento, a uniformidade de comprimento, o índice *micronaire* (espessura e teceabilidade da fibra), a resistência e o alongamento do fio demonstram fibras equivalentes ou com qualidade superior às fibras produzidas pela variedade parental Coker 312 ou pelas variedades comerciais (Kerby et al., 2000).

Avaliações da tolerância ao herbicida glifosato, do fenótipo e da performance agronômica do algodão MON 1445 cultivar DP50RR foram realizadas no Brasil. Os estudos de campo foram realizados nas safras de 1999/2000 e 2002/2003 em locais típicos de cultivo do algodão no país, simulando a produção comercial brasileira. As avaliações do fenótipo e do desempenho agronômico do algodão MON 1445 cultivar DP50RR foram realizadas durante 1999/2000 em três locais. O experimento seguiu as práticas agronômicas convencionais, tipicamente utilizadas em avaliações de novos cultivares e avaliou os seguintes parâmetros: número de nós, altura da planta, posição do primeiro ramo, bolas por metro linear, suscetibilidade a doenças (*Colletotrichum* sp., *Ramularia* sp., Doença Azul, Vermelhão e *Alternaria* sp.), capulhos por metro, e produtividade. Diferenças significativas não foram observadas nos aspectos fenotípicos ou morfológicos, ou no desempenho agronômico entre as cultivares DP50 (convencional) e DP50RR (algodão MON 1445) para os parâmetros avaliados.

Durante a safra 2002/2003 os parâmetros fenotípicos, morfológicos e agronômicos do algodão MON 1445 foram novamente avaliados e expandidos. Os experimentos foram realizados em dois locais e compararam o desenvolvimento do algodão MON 1445 cultivar DP50RR, do algodão convencional DP50 (parental recorrente) e de oito cultivares comerciais (quatro em cada local). Comparações entre o algodão DP50RR e as variedades comerciais foram realizadas durante a safra para os seguintes parâmetros: vigor da planta,

ciclo de florescimento, altura da planta, precocidade de maturação, ciclo até colheita, retenção da pluma pela cápsula após a deiscência, peso do capulho, peso médio de 1000 sementes, porcentagem de fibras, suscetibilidade a doenças e pragas (*Colletotrichum* sp., *Ramularia* sp., Doença Azul, Vermelhão e *Alternaria* sp.), produtividade e qualidade de fibra. Não foram observadas diferenças significativas entre o cultivar DP50RR, com ou sem aplicação de glifosato, e seu parental recorrente convencional DP50 nos parâmetros fenotípicos, morfológicos e agronômicos avaliados. Em resumo, as avaliações das características fenotípicas e agronômicas do algodão MON 1445 cultivar DP50RR realizadas no Brasil têm resultados semelhantes aos encontrados em outras regiões do mundo em plantio experimental e comercial. Com exceção da tolerância ao herbicida glifosato, resultante da expressão do gene *cp4 epsps*, o algodão MON 1445 demonstra características fenotípicas e agronômicas equivalentes ao padrão de linhagens parentais convencionais e/ou de cultivares de algodão comerciais.

3.2. Estabilidade da característica de tolerância ao glifosato

As primeiras avaliações sobre a estabilidade da característica de tolerância ao glifosato no algodão MON 1445, foram realizadas a partir da safra de 1993 em seis locais típicos de produção comercial nos Estados Unidos com plantas da terceira geração (R₄) (Serdy e Nida, 1995). As evidências experimentais medidas pela expressão da proteína CP4 EPSPS e pela tolerância ao herbicida Roundup[®] apontam para a estabilidade funcional do gene *cp4 epsps* em todas as condições. Embora ocorram pequenas variações no desempenho agronômico, as quais são relacionadas à ampla variedade genética do germoplasma de algodão, nenhuma alteração fenotípica quanto ao grau de tolerância ao glifosato foi observada em avaliações de campo durante várias gerações e em linhagens comerciais seja em condições experimentais, seja em extensas áreas de plantio comercial em diferentes ambientes. No Brasil, a estabilidade da expressão do gene *cp4 epsps* no algodão MON 1445 foi avaliada na cultivar DP50RR (sementes BC3F4). Os experimentos foram instalados em 1999/2000 em três locais e em 2002/2003 em outros três locais. Esses estudos foram realizados em áreas representativas do cultivo do algodão, utilizando as práticas agrícolas convencionais para cada região e sujeitos ao estresse dessas condições naturais. Em todos os locais testados, a cultivar DP50RR demonstrou expressão do gene *cp4 epsps* e tolerância ao herbicida glifosato em um nível constante e estável. Em resumo, experimentos de campo e plantio comercial com várias gerações e derivados do algodão MON 1445 realizados desde 1993 demonstram um fenótipo estável de tolerância ao herbicida glifosato que ocorre como uma característica monogênica de alta herdabilidade e que sofre pouco efeito do ambiente em sua expressão.

3.3. Tolerância e eficácia

As primeiras avaliações da tolerância ao glifosato e do fenótipo das plantas algodão MON 1445 foram realizadas em 1991, em casa de vegetação, com plantas R₁ (progênie da planta transformada inicialmente, denominada R₀) (Nida et al., 1996a). Após essas avaliações iniciais e posterior multiplicação de sementes, as características fenotípicas e o desempenho agronômico foram avaliados no campo em seis locais típicos de produção comercial nos Estados Unidos com plantas da quarta geração (R₄) durante a safra de 1993 (Nida et al., 1996a; Serdy e Nida, 1995). As avaliações foram repetidas em seis locais nos Estados Unidos durante a safra de 1994 com plantas da quinta geração (R₅) (Serdy e Nida, 1995). Subseqüentemente, plantas R₃ foram cruzadas com variedades elite para eventual introdução comercial.

Avaliações pré-comerciais em experimentos de campo realizados em 1992, 1993 e 1994 em vários locais nos Estados Unidos e outros países, como também resultados de produção pós-comercial, têm demonstrado a tolerância do algodão MON 1445 ao glifosato em aplicações foliares até ao estágio de quatro folhas (V4). As observações foram realizadas para qualquer indicação de efeitos negativos na parte vegetativa e reprodutiva da planta (i.e., falha na deposição do pólen, nódulo de fertilidade, desenvolvimento da primeira maçã e frequência de aborto do fruto). Quando utilizado de acordo com as recomendações para o uso, o glifosato não afeta o crescimento, o desenvolvimento, o rendimento ou a qualidade das fibras. O uso do glifosato tem demonstrado alta eficácia no controle da maioria das plantas daninhas gramíneas anuais e perenes e plantas daninhas de folha larga presentes em plantações de algodão. Em países onde o algodão MON 1445 é cultivado, observa-se uma mudança na utilização de herbicidas para o controle de plantas daninhas com uma diminuição no uso de herbicidas residuais em favor de herbicidas com um perfil de menor impacto ambiental. Na Argentina, por exemplo, a situação do uso de herbicidas foi alterada com o uso de culturas geneticamente modificadas tolerantes a herbicidas (Trigo e Cap, 2003). As práticas agrícolas usam herbicidas em grandes quantidades, mas o glifosato é um produto sem efeito residual e que é rapidamente degradado no solo. Só isso já constitui uma vantagem definitiva sobre a atrazina, por exemplo, que tem grande atividade residual e era o herbicida mais usado antes do advento da tecnologia tolerante ao glifosato na Argentina.

Estudos foram realizados no Brasil para avaliação da eficácia e da seletividade do glifosato nas safras 1999/2000 e 2002/2003 utilizando diferentes formulações desse princípio ativo aplicadas em diferentes doses, épocas, em aplicações únicas e seqüenciais. De maneira geral, o algodão MON 1445 demonstrou tolerância ao glifosato até o estágio V4 em aplicação foliar em área total e aplicações seqüenciais dirigidas em doses necessárias para o controle das principais espécies infestantes presentes nos locais dos estudos: *Acanthospermum australe* (carrapichinho), *Alternanthera tenella* (apaga-fogo), *Amaranthus* spp (caruru), *Bidens pilosa* (picão preto), *Cenchrus echinatus* (capim-carrapicho), *Commelina benghalensis* (traporeaba), *Digitaria horizontalis* (capim-colchão), *Eleusine indica* (capim-pé-de-galinha), *Ipomea grandifolia* (corda-de-viola), *Merremia cissoides* (corriola), *Portulaca oleracea* (beldroega), *Richardia brasiliensis* (poaia-branca), *Sida spinosa* (guaxuma) e *Tridax procumbens*. Nas doses e estádios de aplicação necessários para o controle dessas espécies infestantes, a produtividade do algodão MON 1445 não é afetada. Os resultados dos experimentos realizados no Brasil correspondem àqueles obtidos em estudos de campo e produção comercial nos Estados Unidos e outros países onde esta tecnologia vem sendo utilizada comercialmente.

4. SEGURANÇA ALIMENTAR

O algodão MON 1445 é tão seguro, saudável e nutritivo quanto o algodão convencional. A função conhecida e a presença das proteínas CP4 EPSPS e NPTII na natureza, além de estudos realizados diretamente com essas proteínas, demonstram que elas não representam um risco à segurança alimentar. Os resultados dos estudos demonstraram a ausência de toxicidade oral aguda em camundongos, e a rápida degradação das proteínas e da perda da atividade enzimática em fluidos gástricos e intestinais humanos simulados. Além disso, as proteínas CP4 EPSPS e NPTII não são homólogas às toxinas ou aos alérgenos conhecidos, estando presentes em níveis muito baixos no algodão MON 1445. Adicionalmente, estas proteínas apresentam um longo histórico de consumo e exposição seguros, ocorrendo de maneira ampla na natureza. E,

finalmente, a proteína CP4 EPSPS expressa no algodão MON 1445 apresenta um longo histórico de consumo seguro, pois ela é a mesma proteína presente na soja Roundup Ready® e em outros alimentos provenientes de culturas Roundup Ready®, já avaliados quanto à biossegurança e liberados para o consumo humano e animal

4.1. Proteína CP4 EPSPS

A segurança da proteína CP4 EPSPS é baseada em: função biológica; histórico de consumo seguro das proteínas EPSPS por humanos; resultados de estudos de segurança *in vivo* e *in vitro* conduzidos com a proteína CP4 EPSPS. A enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) é encontrada em grande parte das plantas e microrganismos. A enzima CP4 EPSPS é naturalmente tolerante ao glifosato e é oriunda da bactéria *Agrobacterium* sp. cepa CP4. A avaliação de segurança, que foi realizada para a enzima CP4 EPSPS em diversas culturas tolerantes ao glifosato, demonstrou que ela não causa danos ao meio ambiente e à saúde humana ou animal. Essa ampla avaliação foi realizada através de estudos com a proteína purificada e com as plantas que a expressam, quanto à presença de potenciais alterações nas suas características (da proteína e/ou da planta). Além disso, o potencial da CP4 EPSPS conferir à planta geneticamente modificada propriedades comuns a plantas daninhas (vantagem seletiva) foi avaliado em relação às culturas convencionais. Os resultados demonstraram que a característica introduzida (tolerância ao glifosato) não altera as características morfológicas, agrônômicas e reprodutivas das plantas geneticamente modificadas com o gene *cp4 epsps*.

Devido à sua função, as enzimas EPSPS são essenciais ao crescimento normal de plantas e microrganismos. Elas atuam na via de biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais e outros compostos fenólicos fundamentais para o desenvolvimento das plantas. Não existe toxicidade associada a essa família de enzimas que apresenta um longo histórico de segurança ambiental e alimentar, já que está presente de maneira ubíqua na natureza e na dieta humana e animal. Além disso, as enzimas EPSPS não são conhecidas por persistirem no ambiente ou por afetarem o fenótipo do organismo hospedeiro com propriedades negativas, como patogenicidade ou potencial de desenvolvimento em plantas daninhas.

A proteína CP4 EPSPS foi produzida em quantidade e com qualidade compatível para a utilização em estudos de segurança (Harrison et al., 1996) através de fermentação de *E. coli* recombinante contendo o gene *cp4 epsps*. A caracterização da proteína CP4 EPSPS obtida de *E. coli* e a determinação da equivalência entre as proteínas produzidas em bactéria e na planta foram realizadas e determinando-se a equivalência entre as proteínas CP4 EPSPS produzidas em organismos diferentes. O estabelecimento desta equivalência demonstrou que a utilização da proteína CP4 EPSPS purificada de bactérias transformadas é válida para avaliações sobre a sua segurança quando a mesma proteína é produzida no algodão MON 1445 (Harrison et al., 1996; Kolacz et al., 1995).

Diversos pesquisadores caracterizaram a proteína CP4 EPSPS e os resultados demonstraram que ela possui propriedades enzimáticas equivalentes às proteínas EPSPS endógenas de plantas e microrganismos (Harrison et al., 1996). Adicionalmente, estudos detalhados demonstraram que a CP4 EPSPS é suscetível à proteólise e digestão enzimática, como seria esperado para as proteínas EPSPS (Harrison et al., 1996). Análises de atividade enzimática e *imunoblot* foram utilizadas para monitorar a degradação da enzima CP4 EPSPS e demonstraram que a meia-vida da proteína em fluido gástrico simulado foi de menos de 15 seg e em fluido intestinal simulado, menos de 10 min. Proteínas que são rapidamente degradadas no trato gastrointestinal geralmente são mais seguras (Astwood et al., 1996; Astwood e Fuchs, 2001). Embora as proteínas EPSPS sejam encontradas em

plantas e microrganismos, as seqüências primárias de aminoácidos apresentam divergência considerável. Análises em bancos de seqüências de peptídeos (ALLPEPTIDES) revelaram que os membros da família de EPSPS podem ter em comum menos de 25% de identidade em uma janela de aproximadamente 450 aminoácidos (que corresponde ao tamanho total da CP4 EPSPS). Apesar desse baixo nível de identidade de seqüências de aminoácidos, as proteínas da família EPSPS são altamente relacionadas em termos de estrutura e função, o que é importante quando se aborda a segurança das proteínas. A avaliação de bioinformática demonstrou que a proteína CP4 EPSPS não compartilha homologia significativa da sua seqüência de aminoácidos com seqüências de toxinas e alergênicos conhecidas e depositadas em bancos de dados de domínio público como PIR, EMBL, SwissProt e GenBank (Metcalfe et al., 1996; Rice et al., 2001). A maior homologia é observada com as demais proteínas EPSPS, que possuem extenso histórico de uso seguro, como mencionado acima.

Em um estudo de toxicidade oral aguda, a CP4 EPSPS foi administrada em camundongos, na forma de dose única elevada, para confirmação de sua segurança (Harrison et al., 1996). Os resultados deste estudo demonstraram, conforme esperado, que a proteína CP4 EPSPS não é tóxica. A administração aguda foi considerada apropriada para a avaliação da segurança da CP4 EPSPS, uma vez que as proteínas tóxicas atuam por meio de mecanismos agudos (Pariza e Foster, 1983; Sjoblad et al., 1992). No estudo realizado com a proteína CP4 EPSPS, não se observou evidência de toxicidade em doses de 572, 154 e 49 mg/kg de peso corporal. Não foram observados sinais clínicos anormais em nenhum dos animais durante o estudo. Não houve diferença em peso corporal, peso corporal cumulativo ou consumo de alimentos entre os tratamentos e os grupos de controle. Todos os animais foram sacrificados no sétimo dia pós-dosagem e submetidos à necropsia, sendo que nenhum efeito patológico foi observado. Baseado nos dados de expressão da proteína CP4 EPSPS no caroço do algodão MON 1445, a dose de 572 mg/kg de peso corporal equivale a um consumo entre 3,2 a 7,1 kg de caroço/kg de peso corporal.

Com base nos resultados desta ampla caracterização de biossegurança, há evidências de que a proteína CP4 EPSPS possui propriedades equivalentes às proteínas EPSPS e, portanto, não possui potencial de dano à saúde humana e animal.

4.2. Proteína NPTII

A segurança da proteína NPTII é baseada em: função biológica; histórico de consumo seguro das proteínas NPTII por humanos; resultados de estudos de segurança *in vivo* e *in vitro* conduzidos com a proteína NPTII. O modo-de-ação da proteína NPTII é bem caracterizado. A NPTII utiliza adenosina-trifosfato (ATP) para realizar a fosforilação do grupo 3'-hidroxil da porção aminohexose de antibióticos aminoglicosídicos como a neomicina, a gentamicina A e as canamicinas A, B e C, inativando estes antibióticos (Beneveniste e Davies, 1973; Schlüter e Potrikus, 1997; Brasileiro, 1998). Quando ativos, os antibióticos aminoglicosídicos inibem a síntese de proteínas nas células procarióticas, ligando-se às subunidades 30S e 50S dos ribossomos e impedindo a iniciação da tradução e, conseqüentemente, a proliferação das bactérias (Davis, 1988). Na célula vegetal, os antibióticos aminoglicosilados atuam da mesma forma, interferindo na síntese protéica, nas mitocôndrias e nos cloroplastos (que possuem ribossomos semelhantes aos procarióticos), resultando em clorose e inibição do crescimento das células (Weide et al., 1989). A enzima NPTII não é produzida normalmente em tecidos vegetais e, portanto, o efeito dos antibióticos aminoglicosilados para células de plantas convencionais é letal. Em plantas geneticamente modificadas que expressam a proteína NPTII, os antibióticos são inativados e não interferem no desenvolvimento normal das suas células.

A proteína NPTII expressa no algodão MON 1445 é química e funcionalmente equivalente à proteína NPTII que ocorre naturalmente. Essa proteína é produzida por vários organismos procarióticos encontrados de forma ubíqua no meio ambiente tanto em habitats aquáticos e terrestres como na microflora intestinal humana e animal (Flavell et al., 1992). Estudos também mostraram que aproximadamente 1% a 3% da população de bactérias do tipo *Bacillus*, encontrada em diferentes tipos de solo brasileiro, produz a proteína NPTII (Van Elsas e Pereira, 1986). As bactérias que produzem essa proteína são encontradas entre os gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas* e as famílias Enterobacteriaceae e Vibrionaceae (Smalla et al., 1993). O gene *nptII* que codifica a proteína NPTII é derivado do transposon Tn5 de *Escherichia coli* (Beck et al., 1982; Bevan et al., 1983), que é uma enterobactéria, presente na flora intestinal do homem. Estima-se que aproximadamente 0,1% da população de microrganismos do trato intestinal da população ocidental seja composto pela *E. coli* (Tannock, 1995). Dessa forma, a exposição dos organismos vivos e do meio ambiente à proteína NPTII é algo que ocorre abundantemente na natureza devido à prevalência de bactérias que a produzem.

A segurança da proteína NPTII em alimentos foi avaliada e confirmada como segura (US FDA, 1994). Essa proteína é degradada no sistema gastrointestinal de humanos e animais, o que, associado ao seu modo-de-ação, à sua especificidade e à ausência de homologia com seqüências tóxicas, faz com que ela não represente risco de toxicidade. Outro fator que contribui para a segurança alimentar da NPTII é que o co-fator ATP, necessário para a sua atividade, é instável em pH baixo como o do sistema digestivo, o que não promoveria a ação da proteína, caso a NPTII não fosse previamente degradada (Nap et al., 1992). Um grupo de especialistas avaliou a proteína NPTII produzida em plantas geneticamente modificadas e concluiu que não há razões para preocupações relativas à segurança dessa proteína (WHO, 1993). Não se espera que organismos como o algodão MON 1445, que expressam a proteína NPTII, sejam inerentemente de maior potencial de dano ao ambiente ou aos organismos vivos do que os organismos que naturalmente produzem essa proteína (Flavell et al., 1992; Smalla et al., 1993). A proteína NPTII não possui atividade pesticida ou inseticida, e o único objetivo de ser produzida na planta é promover um sistema eficiente de seleção de transformantes. As avaliações de segurança da proteína NPTII para humanos e animais incluem informações sobre a caracterização das propriedades biológicas e físico-químicas da proteína expressa, e avaliações da digestibilidade, do potencial de alergenicidade e de toxicidade da proteína para mamíferos. Os parágrafos seguintes resumem os resultados desses estudos que demonstram que a proteína NPTII não é tóxica para mamíferos e, portanto, apresenta uma biossegurança aceitável para humanos.

A proteína NPTII foi também produzida em *E. coli* e purificada, mostrando-se equivalente àquela expressa em plantas geneticamente modificadas (Fuchs et al., 1993a). O estudo de digestibilidade realizado com a proteína NPTII mostrou que ela é rapidamente degradada sob condições digestivas simuladas para mamíferos (Fuchs et al., 1993b). A degradação da proteína NPTII em fluidos gástrico e intestinal simulados foi avaliada por *Western blot*, mostrando que a atividade enzimática da proteína NPTII foi destruída após dois minutos de incubação no fluido gástrico simulado e 15 min de incubação no fluido intestinal simulado. Isso constitui um risco mínimo de toxicidade ou alergia quando a NPTII é comparada às demais proteínas da dieta (Astwood et al., 1996; Astwood e Fuchs, 1996).

Outro fator significativo que contribui para a alergenicidade de certas proteínas de alimentos é sua alta concentração no alimento (Taylor, 1992; Taylor et al., 1987; Fuchs e Astwood, 1996). Em contraste com essa generalidade para proteínas alergênicas comuns, a proteína NPTII está presente em baixa quantidade no algodão MON 1445.

Uma comparação do grau de similaridade de aminoácidos da proteína NPTII com proteínas tóxicas foi realizada usando a palavra-chave “toxina” e outras na pesquisa nos bancos de dados públicos (GenBank, EMBL, PIR e SwissProt). A proteína NPTII produzida no algodão não mostrou nenhuma homologia com toxinas que pudesse levantar preocupações com relação à segurança alimentar do algodão MON 1445. A comparação com um banco de dados de 4.677 seqüências protéicas associadas com toxicidade mostrou que a proteína NPTII não é similar a toxinas relevantes para a saúde humana e animal (Hileman et al., 2002; Hileman e Astwood, 2000a). Para avaliar similaridade com proteínas alergênicas, a seqüência de aminoácidos da proteína NPTII foi comparada às seqüências desse tipo de proteína depositadas nos bancos de dados (Pearson e Lipman, 1988; Hileman et al., 2002), o que mostrou que a proteína NPTII não compartilha de qualquer similaridade significativa com as seqüências de aminoácidos de alérgenos conhecidos (Kolacz et al., 1995; Astwood et al., 1996; Hileman e Astwood, 2000b).

O estudo de toxicidade oral aguda realizado com a proteína NPTII utilizou uma dose da proteína teste de 5.000 mg/kg de peso corporal (Fuchs et al., 1993b). Duas doses menores (1.000 mg/kg e 100 mg/kg de peso corporal) foram também incluídas. Esse estudo revelou a ausência de efeitos tóxicos pela ingestão da proteína NPTII por camundongos, demonstrando que ela é também segura quando produzida no algodão MON 1445. Todos os animais foram sacrificados no sétimo dia pós-dosagem e submetidos à necropsia, sendo que nenhum efeito patológico foi observado. Baseado nos dados de expressão da proteína NPTII no caroço do algodão MON 1445, a dose de 5.000 mg/kg de peso corporal equivale a um consumo de aproximadamente 700 kg de caroço/kg de peso corporal.

4.3. Composição nutricional e estudos com animais

A avaliação nutricional faz parte das avaliações de segurança de uma cultura geneticamente modificada, de forma a determinar os seus efeitos sobre a saúde animal e sobre a qualidade dos produtos utilizados na alimentação humana (Flachowsky et al., 2005). Os resultados dos inúmeros estudos realizados até o momento têm reafirmado a ausência de diferenças significativas na segurança e no valor nutricional das rações contendo produtos derivados de plantas geneticamente modificadas que são utilizadas para alimentação animal, quando comparadas às contra-partes convencionais. Adicionalmente, resíduos do DNA e das proteínas exógenas não foram encontrados em órgãos e tecidos coletados de animais alimentados com ração ou partes de vegetal derivados de plantas geneticamente modificadas.

Os estudos de avaliação de segurança alimentar e nutricional com o algodão MON 1445 foram baseados na aplicação do princípio da Equivalência Substancial, que é adotado por organizações internacionais e órgãos reguladores como a WHO, a FAO, a OECD e o ILSI. De acordo com essa abordagem, se uma nova ração ou um novo alimento derivado de uma cultura geneticamente modificada for substancialmente equivalente à seu correspondente convencional e as novas proteínas produzidas são consideradas seguras, então a cultura geneticamente modificada é considerada “tão segura quanto” a cultura convencional. Além da avaliação da composição da cultura geneticamente modificada, do conhecimento sobre os genes introduzidos e as proteínas expressas, da caracterização molecular e da estabilidade das características introduzidas, estudos nutricionais são necessários para que os efeitos sejam avaliados não apenas sobre esses animais, mas também sobre a composição dos produtos deles derivados.

A composição (proteínas, gorduras, fibras, carboidratos, aminoácidos, resíduos minerais, teor calórico, lipídeos, ácidos graxos, α -tocoferol e gossipol) do caroço do algodão MON 1445 mostrou equivalência em relação ao padrão de composição de caroço da

variedade parental e/ou das variedades comerciais (Nida et al., 1996b). As análises de composição foram realizadas com caroço, torta gorda, farelo torrado, óleo bruto e óleo refinado obtidos do algodão MON 1445, Coker 312 e variedades comerciais de algodão. As amostras foram obtidas em experimentos de campo conduzidos nos Estados Unidos durante 1993 e 1994 e no Brasil durante 2002/2003. As análises de composição e as avaliações nutricionais mostraram que o algodão MON 1445 e suas frações processadas foram comparáveis ao algodão convencional, levando em consideração a variabilidade natural existente entre as linhagens de algodão comerciais. Os subprodutos do algodão MON 1445 se mostraram tão seguros e nutritivos quanto os subprodutos do algodão convencional para o uso/consumo humano e animal. Os valores de composição encontrados em amostras coletadas no Brasil são comparáveis com aqueles obtidos nas análises bromatológicas realizadas nos Estados Unidos e estão dentro dos intervalos compilados e publicados pelo ILSI (www.cropcomposition.org). Os resultados confirmam a equivalência da composição do caroço do algodão MON 1445 com o caroço de algodão convencional produzido em ambientes agrícolas brasileiros.

Os estudos realizados com animais (ratos, codornas, peixe e vacas leiteiras) mostraram que a qualidade nutricional do caroço do algodão MON 1445 foi a mesma daquela verificada no algodão convencional e o desenvolvimento dos animais não foi alterado pela ingestão de qualquer dos materiais (Hartnell et al., 2001; Castillo et al., 2001; Kolacz et al., 1995). O algodão MON 1445 e as proteínas CP4 EPSPS e NPTII expressas nos tecidos da planta se mostraram seguros e com valor nutritivo equivalente para o consumo humano e animal.

5. SEGURANÇA AMBIENTAL

Desde a primeira comercialização das culturas tolerantes ao glifosato em 1995, a experiência acumulada com o plantio e consumo de culturas que expressam essa característica (soja, milho, algodão e beterraba) representa um amplo histórico de uso seguro. Durante esse período de mais de 10 anos, não foi observada nenhuma evidência de efeitos adversos das culturas que expressam a proteína CP4 EPSPS sobre organismos não-alvo. O algodão MON 1445, que apresenta a característica de tolerância ao glifosato, oferece inúmeros benefícios ambientais como: redução do uso de herbicidas com efeito residual; redução do número de aplicações para controlar as plantas daninhas; uso do plantio direto; e melhor qualidade da água. Além disso, a sua segurança ambiental é equivalente ao algodão convencional, o que foi demonstrado na avaliação de diversos parâmetros utilizados para medir a segurança do glifosato e de culturas tolerantes a este herbicida.

Em se tratando de segurança ambiental, o primeiro aspecto a ser considerado é que a proteína CP4 EPSPS não é uma proteína nova presente no meio ambiente. O gene *cp4 epsps* utilizado em transformação genética para a geração de plantas tolerantes ao glifosato é derivado da *Agrobacterium* sp. cepa CP4, uma bactéria que teve esse gene naturalmente mutado, sem a ação do homem. Essa mutação natural fez com que o gene *cp4 epsps* passasse a codificar a produção da enzima CP4 EPSPS tolerante ao glifosato. Entretanto, a enzima CP4 EPSPS é estrutural e funcionalmente semelhante às enzimas EPSPS endógenas de plantas e microrganismos, uma família maior de proteínas EPSPS que são relacionadas. As EPSPS são ubíquas na natureza (bactérias, fungos, algas e plantas superiores), não possuem toxicidade conhecida, não têm associação com patogenicidade e não conferem vantagem seletiva aos organismos que as produzem.

5.1. Organismos não-alvo

As enzimas EPSPS não possuem um organismo-alvo, pois estão envolvidas na via bioquímica do ácido chiquímico em plantas e microrganismos, e não possuem atividade inseticida ou similar. Qualquer organismo não-alvo que interage com uma cultura vegetal apresenta uma interação íntima com inúmeras plantas e microrganismos e, portanto, é constantemente exposto às enzimas EPSPS. Com base no histórico de ocorrência dessa família de proteínas e exposição segura, não há evidências que qualquer proteína EPSPS apresentará atividade biológica sobre organismos não-alvo. A interação do algodão MON 1445 com patógenos e insetos-praga não é diferente da interação verificada entre o algodão convencional e tais organismos, o que mostra que a expressão da proteína CP4 EPSPS não causa efeitos sobre organismos normalmente presentes nas áreas de cultivo.

Os estudos realizados com animais (ratos, codornas, peixes e vacas leiteiras) mostraram que a qualidade nutricional do caroço do algodão MON 1445 foi a mesma daquela verificada no algodão convencional e o desenvolvimento dos animais não foi alterado pela ingestão de qualquer dos materiais (Hartnell et al., 2001; Castillo et al., 2001; Kolacz et al., 1995). Os dados desses estudos nutricionais com animais utilizando o algodão MON 1445 na dieta não demonstram evidência de que efeitos adversos em animais vertebrados silvestres que interagem com o algodão MON 1445 cultivado pudessem ocorrer, comprovando também sua segurança ambiental.

Após mais de 10 anos de cultivo de culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato em vários países (James, 2006; Brookes e Barfoot, 2006; Brookes e Barfoot, 2007) existe um histórico de uso seguro que demonstra que as culturas que expressam a proteína CP4 EPSPS não apresentam risco significativo ao meio ambiente. A proteína CP4 EPSPS presente nestas culturas é equivalente à proteína do algodão MON 1445. Pode-se concluir, portanto, que o algodão MON 1445 não impõe impacto adverso sobre espécies animais que vivem nos ambientes de cultivo.

5.2. Transferência gênica

Outro fator avaliado para determinar a segurança ambiental do algodão MON 1445 é a possibilidade de transferência gênica (ou fluxo gênico), que pode ser definida como a incorporação de seqüências de DNA no genoma de uma ou mais populações, sejam elas da mesma espécie ou não (Futuyma, 1998). Esse movimento de genes é um dos fatores determinantes da estrutura genética de uma população natural e é fortemente influenciado pela biologia das espécies, entre outros fatores. A transferência de genes pode ser vertical ou horizontal. A primeira é definida como a transferência de informação genética de um organismo individual para sua progênie por meio dos mecanismos convencionais de herdabilidade (Ammann et al., 1996; Glover, 2002; Wozniak, 2002). Por outro lado, a transferência gênica horizontal (ou lateral) é o movimento de material genético entre indivíduos que não são sexualmente compatíveis, ou seja, um movimento independente dos mecanismos normais de reprodução (Smalla et al., 2000; Glover, 2002).

Transferência gênica vertical

Na avaliação do risco associado à transferência dos genes *cp4 epsps*, *nptII* e *aad* do algodão MON 1445 para o algodão convencional e orgânico, o potencial de ocorrência da transferência de genes e o efeito que essa transferência poderia acarretar devem ser analisados. Os principais fatores que afetam a transferência gênica entre os cultivos são: a distância entre eles; o clima durante a polinização (temperatura, direção e velocidade do

vento); e o grau de sincronia de florescimento dos cultivares presentes nas plantações adjacentes no período de polinização (Mackenzie e Henry, 1990). Caso essa dispersão venha a ocorrer, deve-se considerar se a transferência confere qualquer vantagem adaptativa ao organismo receptor que cause um desequilíbrio adverso no ecossistema (Nielsen et al., 2000; Glover, 2002).

No caso do algodão, a polinização cruzada ocorre através de insetos polinizadores que levam o pólen para variedades comerciais convencionais e para espécies de algodão silvestres (caso presentes nas áreas de cultivo) que sejam sexualmente compatíveis. A importância desse tipo de transferência é minimizada quando se considera a distância entre as áreas de cultivo e os centros de origem e de ocorrência de espécies silvestres. O sucesso da transferência gênica vertical depende da polinização e da consequente transferência de genes entre espécies sexualmente compatíveis (Ammann et al., 1996). Não existem evidências de que a característica de tolerância ao glifosato presente no algodão MON 1445 possa ser transferida para outros organismos que ocorrem no ambiente ao redor, muito embora o Brasil seja o centro de origem da espécie *Gossypium mustelinum* e o centro de distribuição das espécies *G. barbadense* L., *G. barbadense* var. *brasiliensis* e *G. hirsutum* var. *marie galante*. Essas são as espécies silvestres ou asselvajadas com as quais o algodão MON 1445 poderia cruzar no Brasil. Portanto, sua presença no país representa a existência de recipientes sexualmente compatíveis com o algodão MON 1445 e de uma probabilidade de transferência gênica para estas espécies nestas regiões (Freire, 2000).

Entretanto, avaliações sobre o risco de transferência gênica vertical do algodão geneticamente modificado para espécies silvestres em ecossistemas não-cultivados mostraram que este risco é baixo devido à distribuição isolada dessas espécies de *Gossypium* e à incompatibilidade genômica entre elas. A formação de flores em espécies silvestres é escassa e a coincidência de fecundidade entre as espécies silvestres e as cultivadas é uma condição que raramente ocorre. Híbridos entre o algodão e as espécies silvestres são geralmente estéreis, instáveis e pouco adaptados. No Brasil, as taxas de cruzamento são baixas e tendem a zero quando a fonte de pólen está a mais de 15 m de distância. Portanto, o risco de transferência gênica vertical entre as espécies silvestres de algodão e o algodão MON 1445 em áreas de plantio comercial é baixo. Já a integridade genética de variedades comercialmente cultivadas é estritamente controlada através de práticas de melhoramento genético e produção de sementes básicas (Araújo et al., 2003). Essas práticas são importantes para que a incorporação inadvertida dos genes presentes no algodão MON 1445 no germoplasma de linhagens de algodão cultivado seja minimizada ou não ocorra.

Transferência gênica horizontal

As preocupações com esse tipo de transferência são particularmente direcionadas à dispersão hipotética de genes que conferem resistência a antibióticos (como o *nptII* e o *aad*) para bactérias patogênicas, comprometendo, assim, o uso desses antibióticos (Prins e Zadoks, 1994; Bertolla e Simonet, 1999; Smalla et al., 2000). Microrganismos encontrados no solo ou em associações com as plantas, no rúmen ou no intestino de animais são capazes de receber DNA de outros organismos por meio de mecanismos de transferência, como conjugação, transdução e transformação (Morrison, 1996; Davison, 1999). Porém a transferência gênica horizontal de plantas para microrganismos é um evento raro na natureza e apenas o mecanismo de transformação possibilitaria esse tipo de transferência (Smalla et al., 2000).

A transferência horizontal entre bactérias tem sido considerada uma fonte significativa de variação em bactérias, com papel importante no processo evolutivo de suas populações e mesmo de eucariotos (Ochman et al., 2000; De la Cruz e Davies, 2000). Evidências de que

genes foram transferidos de plantas para bactérias durante a evolução foram obtidas de análises das seqüências de nucleotídeos e proteínas (Bertolla et al., 2000). A transferência horizontal entre bactérias é particularmente comum quando envolve a transferência de plasmídeos e de transposons (Courvalin, 1994; Landis et al., 2000). Já a transferência de DNA de plantas para bactérias, apesar de ser teoricamente possível, só foi conseguida sob condições de laboratório especificamente otimizadas para esse tipo de transferência em freqüências extremamente baixas. A probabilidade de esse tipo de transferência horizontal ocorrer na natureza e envolver genes funcionais é bem menor, uma vez que pressupõe alguns fatores endógenos das células bacterianas, que tendem a limitar a extensão da transferência, particularmente entre organismos distantes filogeneticamente, como o caso de plantas e bactérias (Bertolla e Simonet, 1999). A transferência de DNA de uma planta para uma bactéria ou de uma planta para espécies de plantas distantes não implica na funcionalidade desse DNA no organismo receptor. A transferência de seqüências que incluem um gene íntegro é bem menos provável e, mesmo que o gene íntegro seja transferido, seqüências regulatórias associadas ao DNA transferido (promotores, “enhancers”, finalizadores) podem não funcionar e os íntrons podem não ser reconhecidos pelo organismo receptor (Conner et al., 2003).

O potencial de transferência gênica horizontal entre plantas geneticamente modificadas e microrganismos tem sido extensivamente avaliado (Prins e Zadoks, 1994; Schlüter et al., 1995; Broer et al., 1996; Nielsen et al., 2000; Nielsen et al., 1998; Bertolla e Simonet, 1999; Beever e Kemp, 2000), mostrando que o cenário mais provável envolve a transformação natural de bactérias competentes com o DNA liberado das células da planta e absorvido por microrganismos presentes no solo, em associação com a planta (epifíticos e endofíticos), ou no trato digestivo de humanos e animais. Não foram encontradas evidências de que os genes introduzidos nas plantas tenham sido transferidos posteriormente para bactérias, no laboratório ou no campo, mostrando que a probabilidade desse evento de transferência ocorrer é virtualmente zero.

Nesse processo, alguns eventos devem ocorrer em seqüência e dependem das seguintes condições: 1- proximidade ecológica entre os organismos em questão e contato fisiológico direto (disponibilidade do DNA); 2- mecanismo explícito pelo qual os fragmentos de DNA atravessam as membranas que separam os dois organismos não relacionados (incorporação do DNA); 3- mecanismo para que o DNA seja liberado do organismo doador, persista no ambiente fora da célula, seja transferido para o organismo receptor e, então, inserido no genoma da célula recipiente (que necessita estar competente para receber esse DNA) na sua forma funcional.

No caso do algodão MON 1445, estão presentes os genes exógenos *cp4 epsps*, *nptII* e *aad*. O gene *cp4 epsps*, que confere tolerância ao glifosato, foi isolado da bactéria *Agrobacterium* sp. cepa CP4, que foi identificada pela *American Type Culture Collection* (Manassas, Virgínia, EUA) como uma espécie de *Agrobacterium*, que ocorre em solos do mundo inteiro e na rizosfera de plantas. Os genes marcadores de seleção *nptII* e *aad* foram isolados de *E. coli*, bactéria amplamente encontrada no meio ambiente e em sistema digestivo de vertebrados, inclusive em humanos (Smalla et al., 1993; Bergogne-Berézín, 1997; Jefferson et al., 1986). Os genes *nptII* e *aad* conferem resistência a antibióticos.

Uma revisão sobre o risco associado à transferência gênica horizontal dos genes marcadores de seleção, como o *nptII* e o *aad*, publicada por Smalla et al. (2000), conclui que é improvável que esses genes possam contribuir de alguma maneira para a dispersão da resistência a antibióticos em populações bacterianas. Genes de resistência já estão amplamente dispersos no meio ambiente e particularmente no solo e em bactérias que colonizam os tratos digestivos animais. A presença de genes de resistência na natureza está provavelmente relacionada com a produção de agentes antibacterianos, que são sintetizados

naturalmente no meio ambiente por organismos saprofitos como actinomicetos. Tais organismos constituem 10% a 50% de todos os microrganismos de solo (Bergogne-Berézin, 1997). A resistência a estreptomicina em organismos é muito comum em diferentes organismos: 18% a 52% das bactérias na rizosfera contêm o gene de resistência (Gilbert et al., 1993) e, aproximadamente, 20% da população de bactérias *E. coli* excretada diariamente pelo homem e por animais como o gado possuem genes de resistência a estreptomicina (Sprinkle et al., 1992). No caso de animais alimentados com ração de caroço de algodão MON 1445, se uma bactéria do trato digestivo adquirisse de alguma maneira os genes *nptII* e *aad*, haveria vantagem seletiva apenas na presença dos antibióticos cuja resistência é conferida por estes genes. As proteínas AAD (que, ressalta-se, não é expressa no algodão MON 1445) e NPTII necessitam ainda de co-fatores específicos para exercerem suas funções. Assim, a transferência horizontal de genes marcadores para a comunidade bacteriana não adicionaria algo novo ao “pool” gênico bacteriano e o potencial de incremento de efeitos adversos é insignificante quando se considera a ampla presença dos genes de resistência já existentes.

Em um outro evento de algodão geneticamente modificado, o algodão Bollgard[®], a frequência desprezível de transferência gênica horizontal do gene *aad* para bactérias foi confirmada em um trabalho realizado em South Sulawesi, na Indonésia. A transferência do gene *aad* de bactéria para a *A. calcoaceticus* ADP1 ocorreu em uma frequência de 10⁻⁶ por recipiente, enquanto a transferência do gene *aad* do algodão Bollgard[®] para a *A. calcoaceticus* ADP1 não foi detectada (< 10⁻¹⁰ por recipiente) (Suwanto et al., 2002).

Apesar da possibilidade da transferência horizontal dos genes exógenos presentes no algodão MON 1445 para bactérias e outros organismos não poder ser totalmente descartada, essa transferência é altamente improvável e, caso viesse a ocorrer, seu impacto seria insignificante. Esses genes não confeririam uma vantagem seletiva ao microrganismo receptor e poderiam até ser uma sobrecarga desvantajosa (Glick, 1995). Além disso, tais genes já estão amplamente dispersos no meio ambiente (particularmente no solo e em bactérias que colonizam os tratos digestivos animais) e a troca de genes entre microrganismos ocorre em frequências bem mais altas do que entre plantas e microrganismos. Os genes *cp4 epsps*, *nptII* e *aad* presentes no genoma do algodão MON 1445 tornaram-se parte integral deste genoma. Uma vez inserido e replicado pelos sistemas internos das células, a única diferença entre o DNA inserido e o DNA original da planta são as seqüências específicas contendo os genes de interesse, que não conferem qualquer característica capaz de alterar o potencial de transferência do segmento de DNA. Com base no exposto acima, conclui-se que o risco de transferência horizontal de genes *cp4 epsps*, *nptII* e *aad* do algodão MON 1445 ao meio ambiente é mínimo e que seu efeito adverso sobre a saúde humana e animal é desprezível.

5.3. Potencial do algodão MON 1445 como planta daninha

O algodão é uma planta com potencial mínimo para se transformar em uma espécie daninha, e isso se aplica também ao algodão MON 1445. Essa cultura não possui nenhuma das características comumente associadas a plantas daninhas, como dormência de sementes, persistência no solo, germinação sob condições ambientais diversas, rápido crescimento vegetativo, ciclo de vida curto, produção alta de sementes e dispersão de sementes a longa distância (Reed, 2000). A semente de algodão pode permanecer no campo após a colheita, germinar sob condições favoráveis e sobreviver a invernos moderados e secos. Entretanto existem tratamentos apropriados para o controle de plantas voluntárias em áreas de plantio de algodão, que incluem o cultivo e o uso de herbicidas. Essas características do algodão não foram alteradas pela modificação genética.

Experimentos de campo durante as fases iniciais de desenvolvimento do algodão MON 1445 e observações em plantios comerciais nos países onde o produto já foi aprovado não demonstram nenhum efeito pleiotrópico indesejável nem mesmo características associadas a plantas daninhas. As observações em plantios experimentais e comerciais indicam que o algodão MON 1445 e seus descendentes mantiveram as mesmas características reprodutivas da contraparte convencional.

Não se espera que as características conferidas pela introdução dos genes *cp4 epsps*, *nptII* e *aad* proporcionem qualquer vantagem competitiva ou uma maior agressividade ao algodão MON 1445, que resultaria em uma espécie invasiva. As características de tolerância ao glifosato e aos antibióticos não tornam o algodão uma planta daninha ou invasiva de habitats naturais, uma vez que suas características reprodutivas e de desenvolvimento não foram alteradas.

6. BENEFÍCIOS

Alguns dos fatores positivos de culturas tolerantes ao glifosato como o algodão MON 1445 são os benefícios, como a possibilidade de redução do uso de vários herbicidas com princípios ativos diferentes e com riscos ecotoxicológicos menos conhecidos do que os do glifosato, que é um herbicida amplamente estudado (Giesy et al., 2001; Cerdeira e Duke, 2006). Uma comparação da utilização de herbicidas mostrou que a quantidade de herbicidas de maior espectro é reduzida em áreas com culturas tolerantes a herbicidas, independente de um aumento da área colhida ou da produtividade (Carpenter et al., 2002). Na Argentina, por exemplo, a situação do uso de herbicidas foi alterada com o uso de culturas geneticamente modificadas tolerantes a herbicidas, sendo que atualmente o glifosato, um produto sem efeito residual e que é rapidamente degradado no solo, é mais utilizado que herbicidas de efeitos residuais mais problemáticos como a atrazina (Trigo e Cap, 2003). A mato-competição é um dos grandes problemas na cultura do algodão, pois impacta tanto no desenvolvimento das plantas como na eficiência do controle de pragas. Portanto, um dos maiores benefícios do algodão MON 1445 é que o controle de plantas daninhas pode ser feito na pós-emergência da cultura. Outro fato é que o algodão MON 1445 proporciona a oportunidade de ampliação de áreas de plantio direto, que sendo uma prática conservacionista de cultivo (Mello, 2002), beneficia o meio ambiente pela redução da erosão do solo, melhoria da qualidade do solo e da água, melhoria do habitat para a vida selvagem e redução do uso de combustível e emissão de CO₂ (Fawcett e Towery, 2002). Outro aspecto ambiental importante é a qualidade das águas que, segundo os estudos realizados nos Estados Unidos, melhorou em áreas onde culturas tolerantes ao glifosato substituíram o uso de herbicidas convencionais (Wauchope et al., 2001). Além desses benefícios, o algodão MON 1445 apresenta alta compatibilidade com o manejo integrado de pragas, proporciona o uso do glifosato em pós-emergência para o controle de plantas daninhas durante a safra, e também o uso de um herbicida de baixo risco para humanos e outros animais (quando usado conforme as especificações de bula), devido à sua especificidade de ação.

Quando se fala de benefícios das culturas geneticamente modificadas, é importante salientar que a área plantada cumulativa entre 1996 e 2006 excedeu meio bilhão de hectares, mais precisamente, chegou a 577 milhões ha, com um aumento de 60 vezes em 10 anos, sem precedentes na história recente do uso de uma tecnologia (James, 2006). Esse incremento da área plantada, que considera todas as principais culturas geneticamente modificadas, é a maior prova de que os benefícios da tecnologia são reconhecidos pelos agricultores. Uma análise dos 10 anos de plantio de culturas geneticamente modificadas,

mostra que a área com culturas tolerantes a herbicidas (como o algodão MON 1445) aparece em primeiro lugar, seguida da área plantada com culturas resistentes a insetos e com produtos que combinam as duas características. Esses últimos têm ganhado o mercado com o passar dos anos. Em 2006, culturas tolerantes a herbicidas ocuparam 70 milhões ha (68% da área plantada), enquanto culturas Bt ocuparam 19 milhões ha (19%) e culturas com as duas características ocuparam 13 milhões ha (13%) da área plantada (James, 2006). Como mencionado acima, um dos maiores benefícios indiretos gerados pelo cultivo de culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato é a redução do uso de diversos herbicidas para o controle de plantas daninhas, principalmente aqueles com alto efeito residual (Carpenter et al., 2002). Tomando o algodão tolerante a herbicidas como exemplo, entre 1996 e 2005, a redução do uso de ingredientes ativos foi da ordem de 15,1%, o que equivale a uma redução de aproximadamente 28,6 milhões Kg de herbicidas nessa cultura geneticamente modificada tolerante a herbicida e de 22,7% no impacto ambiental causado por ela em relação ao algodão convencional (Brookes e Barfoot, 2006; Brookes e Barfoot, 2007).

Brookes e Barfoot (2006) relataram que um dos benefícios advindos do plantio de plantas geneticamente modificadas como o algodão MON 1445 tem sido a redução da emissão de CO₂ no meio ambiente, redução esta a partir de duas fontes. A primeira é a redução no uso de óleo diesel, resultante do menor trânsito de máquinas agrícolas, pela menor necessidade de aplicações de pesticidas e de preparo do solo. O menor uso de combustível nessas culturas resultou na redução da emissão de aproximadamente 1 bilhão kg CO₂ em 2005. A segunda fonte de redução da emissão de CO₂ ocorre pela redução no preparo do solo associada ao maior emprego de plantio direto utilizando as culturas geneticamente modificadas, diminuindo a perda de carbono pela oxidação da matéria orgânica do solo, o que resultou numa redução das emissões de mais de 8 bilhões kg CO₂ no mesmo ano. Esses dois fatores foram determinantes na redução combinada de mais de 9 bilhões kg de emissões de CO₂ na atmosfera devido ao plantio de culturas geneticamente modificadas como o algodão MON 1445, o que equivale à retirada de quase 4 milhões de carros das ruas em um ano. Esses dados demonstram que o plantio de culturas geneticamente modificadas é uma tecnologia limpa que traz muitos benefícios ambientais importantes.

7. CONCLUSÕES

O algodão MON 1445 foi gerado através de transformação genética de uma cultivar convencional com o gene *cp4 epsps*, que codifica a enzima CP4 EPSPS, a qual confere a característica de tolerância ao glifosato na planta. A proteína exógena CP4 EPSPS é similar às demais proteínas da família das EPSPS, que são amplamente encontradas na natureza. Avaliações detalhadas de segurança alimentar e ambiental confirmaram a biossegurança do algodão MON 1445. As análises incluíram: caracterização molecular detalhada do DNA introduzido no genoma do algodão; avaliações de segurança da proteína exógena; análises de composição de folhas e caroços; estabelecimento da equivalência nutricional dos caroços em estudos nutricionais com animais; comparação das características agrônômicas do algodão MON 1445 com variedades convencionais; e observações de campo para avaliar as interações com doenças e pragas. Esses estudos demonstraram que a proteína CP4 EPSPS não é tóxica a organismos não-alvo, incluindo humanos, peixes, aves, outros mamíferos e insetos. Além disso, as variedades que contêm o evento MON 1445 se mostraram tão seguras e nutritivas quanto as variedades convencionais de algodão, e não causam impacto ambiental maior do que aquele provocado pelo cultivo de algodão convencional.

Em resumo, o algodão MON 1445 tolerante ao glifosato é tão seguro quanto o algodão convencional e constitui um sistema efetivo, flexível e simples para o controle de plantas daninhas na cultura do algodão, com potencial para aumento de produtividade; redução dos problemas gerados pela mata-competição; redução de custos pela diminuição do uso de produtos herbicidas e do número de aplicações necessárias para o controle efetivo das plantas daninhas; adequação e encorajamento para a adoção de sistemas conservacionistas de cultivo como o plantio direto; melhoria da qualidade da água em fontes vulneráveis através da redução da aplicação de herbicidas que apresentam alta lixiviação. A sua segurança alimentar e ambiental é equivalente à do algodão convencional, o que foi demonstrado através de diversos estudos específicos com a proteína CP4 EPSPS, análises dos nutrientes-chave, equivalência nutricional e avaliações ambientais. No Brasil, os resultados de estudos de eficácia agrônômica e tolerância, assim como das avaliações agrônômicas, de descritores morfológicos, de expressão da proteína CP4 EPSPS e de composição (bromatologia) demonstraram que o algodão MON 1445 é equivalente e tão seguro quanto o algodão convencional em relação à sua biossegurança alimentar e ambiental.

8. REFERÊNCIAS

- Alibhai, M.; Stallings, W.C. 2001. Closing down on glyphosate inhibition with a new structure for drug discovery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 2944-2946.
- Ammann, K.; Jacot, Y.; Mazyad, P.; Rufener, P. 1996. Field release of transgenic crops in Switzerland- an ecological risk assessment of vertical gene flow. *Gentechnisch Veränderte Krankheitsund Schadlingsresistente Nutzpflanzen*. 1, Ch. 3:1-157. (<http://www.bats.ch/data/english/k3titel.htm>)
- Araújo, A.S.F.; Monteiro, R.T.R.; Abarkeli, R.B. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*. 52: 799-804.
- Astwood, J.; Fuchs, R. 2001. Status and safety of biotech crops. *ACS Symposium Series 774: Agrochemical Discovery Insect, Weed, and Fungal Control*. Editors: Baker, D. R. e Umetsu, N. K. Ch. 14: 152-164.
- Astwood, J.D.; Fuchs, R.L. 1996. Food allergens are stable to digestion in a simple model of the gastrointestinal tract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 241.
- Astwood, J.D.; Leach, J.N.; Fuchs, R.L. 1996. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology*. 14:1269-1273.

- Barry, G.; Kishore, G.; Padgett, S.; Taylor, M.; Kolacz, K.; Weldon, M.; Re, D.; Eichholtz, D.; Fincher, K.; Hallas, L. 1992. Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*. Singh, B. K.; Flores, H. E. e Shannon, J. C. editors. American Society of Plant Physiologists. 139-145.
- Beck, E.; Ludwig, G.; Auerswald, E.A.; Reiss, B.; Schaller, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*. 19: 327-336.
- Beever, D.E.; Kemp, C.F. 2000. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutrition Abstracts and Reviews Series B: Livestock feeds and feeding*. 70: 175-182.
- Beneveniste, R.; Davies, J. 1973. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 42: 471-506.
- Bergogne-Berézín, E. 1997. Who or what is the source of antibiotic resistance? *Journal of Medical Microbiology*. 46: 461-464.
- Bertolla, F.; Kay, E.; Simonet, P. 2000. Potential dissemination of antibiotic resistance genes from transgenic plants to microorganisms. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 21(6): 390-393.
- Bertolla, F.; Simonet, P. 1999. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Re. Microbiol.* 150: 375-384.
- Bevan, M.; Barnes, W.M.; Chilton, M.D. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucl. Acid Res.* 11(2): 369-385.
- Brasileiro, A.C.M. 1998. Neomicina fosfotransferase II (NPTII). In: Brasileiro, A.C.M., Carneiro, V.T.C., ed. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 143-162.
- Broer, I.; Droge-Laser, W.; Gerke, M. 1996. Examination of the putative horizontal gene transfer from transgenic plants to agrobacteria. pp. 67-70. In: E.R. Schmidt; T. Hankeln (eds.). *Transgenic organisms and biosafety*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Brookes, G.; Barfoot, P. 2006. Global impact of biotech crops: socio-economic and environmental effects in the first ten years of commercial use. *AgBioForum*. 9(3): 139-151.
- Brookes, G.; Barfoot, P. 2007. *GM Crops: The First Ten Years - Global Socio-Economic and Environmental Impacts*. (www.pgeconomics.co.uk).
- Carpenter, J.; Felsot, A.; Goode, T.; Hammig, M.; Onstad, D.; Sankula, S. 2002. Comparative environmental impacts of biotechnology-derived and traditional soybean, corn and cotton crops. Council for Agricultural and Science Technology Report, Ames, Iowa. 200p. Disponível em: www.cast-science.org.
- Castillo, A.R.; Gallardo, M.R.; Maciel, M.; Giordano, J.M.; Conti, G.A.; Gaggiotti, M.C.; Quaino, O.; Gianni, C.; Hartnell, G.F. 2001. Effect of feeding dairy cows with either Bollgard, Bollgard II, Roundup Ready or control cottonseeds on feed intake, milk yield and milk composition. *J. Dairy Sci.* 84 (Suppl. 1), Abstract 1712.
- Cerdeira, A.L.; Duke, S.O. 2006. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. *J. Environm. Qual.* 35: 1633-1658.
- Conner, A.; Glare, T.; Nap, J. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part II – Overview of Ecological Risk Assessment. *The Plant Journal*. 33: 19-46.
- Courvalin, P. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1447-1451.
- Davis, B.D. 1988. The lethal action of aminoglycosides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 22: 1-3.
- Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*. 42: 73-91.
- De la Cruz, F.; Davies, J. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 8: 128-133.
- Fawcett, R.; Towery, D. 2002. Conservation tillage and plant biotechnology - how new technologies can improve the environment by reducing the need to plow. *Conservatory Technology Information Center*. 1-24.
- Flachowsky, G.; Chesson, A.; Aulrich, K. 2005. Animal nutrition with feeds from genetically modified plants. *Archives of Animal Nutrition*. 59(1): 1-40.
- Flavell, R.B.; Dart, E.; Fuchs, R.L.; Fraley, R.T. 1992. Selectable marker genes: safe for plants? *Bio/Technology*. 10: 141-144.
- Franz, J.E.; Mao, M.K.; Sikorski, J.A. 1997. Glyphosate: A unique global herbicide. American Chemical Society (ACS), Washington, DC. ACS Monograph No. 189.
- Freire, E.C. 2000. Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil. Embrapa, Campina Grande. 22p.
- Fuchs, R.L.; Astwood, J.D. 1996. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technol.* 50: 83-88.
- Fuchs, R.L.; Heere, R.A.; Gustafson, M.E.; Rogan, G.J.; Bartnicki, D.E.; Leimgruber, R.M.; Finn, R.F.; Hershman, A.; Berberich, S.A. 1993a. Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein and its equivalence to the plant expressed protein. *Bio/Technology*. 11: 1537-1542.

- Fuchs, R.L.; Ream, J.E.; Hammond, B.G.; Naylor, M.W.; Leimgruber, R.M.; Berberich, S.A. 1993b. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Biotechnology (NY)*. 11: 1543-1547.
- Futuyma, D.J. 1998. *Evolutionary Biology*. Sunderland: Sinauer. 3rd edition.
- Giesy, J.P.; Dobson, S.; Solomon, K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 167: 35-120.
- Gilbert, G.S.; Parke, J.L.; Clayton, M.K.; Handelsman, J. 1993. Effects of introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology*. 74: 840-854.
- Glick, B.R. 1995. Metabolic load and heterologous gene expression, *Biotechnol. Adv.* 13: 247-261.
- Glover, J. 2002. Gene flow study: implications for GM crop release in Australia. Bureau of Rural Sciences, Canberra, Austrália. 71p.
- Harrison, L.A.; Bailey, M.R.; Naylor, M.W.; Ream, J.E.; Hammond, B.G.; Nida, D.L.; Burnette, B.L.; Nickson, T.E.; Mitsky, T.A.; Taylor, M.L.; Fuchs, R.L.; Padgett, S.R. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutrition*. 126: 728-740.
- Hartnell, G.F.; Gianni, C.; Videla, G.W.; Castillo, A.R.; Maciel, M.; Gallardo, M. 2001. Effect of feeding cottonseed produced from cotton containing Bollgard®, Bollgard® II or Roundup Ready® on feed intake, milk production and composition in lactating dairy cows in Argentina. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-17294.
- Haslam, E. 1993. Shikimic acid: metabolism and metabolites. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Hileman, R.E.; Astwood, J.D. 2000a. Bioinformatics analysis of NPTII protein sequence utilizing toxin and public domain genetic databases. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-16800.
- Hileman, R.E.; Astwood, J.D. 2000b. Bioinformatics analysis of NPTII protein sequence utilizing an allergen database. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-16801.
- Hileman, R.E.; Silvanovich, A.; Goodman, R.E. 2002. Bioinformatic method for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128: 280-291.
- James, C. 2006. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. ISAAA Brief no. 35. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. 1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *PNAS USA*. 83: 8447-8451.
- Kerby, T.; Hugie, B.; Howard, K.; Bates, M.; Burgess, J.; Mahaffey, J. 2000. Fiber quality comparisons among varieties for conventional, Bollgard® and Roundup Ready® versions. Proc. Beltwide Cotton Conf. National Cotton Council. 1: 484-488.
- Kolacz, K.; Nida, D.L.; Serdy, F.S. 1995. Safety compositional and nutritional aspects of cotton with the Roundup Ready™ Gene, lines 1445 & 1698. Conclusion Based on Studies and Information Evaluated According to FDA's Policy on Foods from New Plant Varieties. Monsanto # 95106.
- Landis, W.G.; Lenart, L.A.; Spromberg, J.A. 2000. Dynamics of horizontal gene transfer and the ecological risk assessment of genetically engineered organisms. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 6: 875-899.
- MacKenzie, D.R.; Henry, S.C. 1990. Biological monitoring of genetically engineered plants and microbes - Proceeding of the Kiawah Island Conference. Bethesda: Agricultural Research Institute Press.
- Malik, J.; Barry, G.; Kishore, G. 1989. The herbicide glyphosate. *BioFactors*. 2: 17-25.
- Mello, I. 2002. Plantio direto e o agronegócio sustentável na metade sul do Rio Grande do Sul. Boletim Informativo da Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha. Informativo 06. 2p.
- Mery, R.; Cothren, J.T. 2002. Effects of Roundup applications on pollen production and growth of Roundup Ready cotton. *In*: 2002 Proc. Beltwide Cotton Conf. Atlanta, GA.
- Metcalfe, D.D.; Astwood, J.D.; Townsend, R.; Sampson, H.A.; Taylor, S.L.; Fuchs, R.L. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. S36: S165-S186.
- Morrison, M. 1996. Do ruminal bacteria exchange genetic material? *J. Dairy Sci.* 79: 1476-1486.
- Nap, J.-P.; Bijvoet, J.; Stikema, W.J. 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants: an overview. *Transgenic Research*. 1: 239-249.
- Nida, D.; Patzer, S.; Harvey, P.; Stipanovic, R.; Wood, R.; Fuchs, R. 1996b. Glyphosate-tolerant cotton: the composition of the cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. *J. Agric. Food Chem.* 44 (7): 1967-1974.
- Nida, D.L.; Kolacz, K.H.; Buehler, R.E.; Deaton, W.R.; Schuler, W.R.; Armstrong, T.A.; Taylor, M.L.; Ebert, C.C.; Rogan, G.J.; Padgett, S.R.; Fuchs, R.L. 1996a. Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. *J. Agric. Food Chem.* 44(7): 1960-1966.
- Nielsen, K.M.; Bones, A.M.; Smalla, K.; Van Elsas, J.D. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - A rare event? *FEMS Microbiology Reviews*. 22: 79-103.
- Nielsen, K.M.; Van Elsas, J.D.; Smalla, K. 2000. Safety issues in antibiotic resistance marker genes in transgenic crops. Proc. of the 6th International Feed Production Conference. p. 146-162.
- Ochman, H.; Lawrence, J.G.; Groisman, E.A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 405: 299-304.

- Pariza, M.W.; Foster, E.M. 1983. Determining the safety of enzymes used in food processing. *J. Food Protection*. 46: 453-468.
- Pearson, W.; Lipman, D. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 2444-2448.
- Prins, T.W.; Zadoks J.C. 1994. Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a Literature review. *Euphytica*. 76: 133-138.
- Reed, A. 2000. Fluxo gênico de pólen do algodão *B.t.* para variedades de algodão convencional e parente selvagens na Índia: um estudo de risco ecológico. Uma revisão não publicada. Monsanto Company, St. Louis, MO, USA.
- Rice E.A.; Goodman, R.E.; Silvanovich, A.; Hileman, R.E.; Astwood, J.D. 2001. Bioinformatic analysis of the CP4 EPSPS protein utilizing ALLERGEN3 and current public domain sequence databases. Relatório Técnico da Monsanto STL MSL-17172,
- Schlüter, K.; Fütterer, J.; Potrykus, I. 1995. "Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs - if at all- at an extremely low frequency. *Bio/Technology*. 13: 1094-1098.
- Schlüter, K.; Potrikus, I. 1997. Anwendungsbeispiele für die Gentechnik bei Lebensmitteln, transgene Nutzpflanzen. *In: Gassen, H.G. & Hammes, W.P. Handbuch Gentechnologie Lebensmittell. 1º Auflage, Hamburg - Behr Verlag.*
- Serdy, F.S.; Nida, D.L. 1995. Petition for determination for non-regulated status, cotton with the Roundup Ready gene, lines 1445 and 1698. Petition submitted to USDA/APHIS/BBEP on February 10, 1995.
- Sjoblad, R.P.; McClintock, J.T.; Engler, R. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regulatory Toxicol. and Pharmacol.* 15:3-9.
- Smalla, K.; Borin, S.; Heuer, H.; Gebhart, F.; Van Elsas, J.D.; Nielsen, K. 2000. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes from Transgenic Plants to Bacteria. *In: Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*, Editors: Farbaim, C., Scoler, G., and Mchughen, A. pp. 146-154.
- Smalla, K.; van Overbeek, L.S.; Pukall, R.; Van Elsas, J.D. 1993. Prevalence of *nptII* e Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiology Ecology*. 13: 47-58.
- Sprinkle, J.E.; Kress, D.D.; Doornos, D.E.; Anderson, D.C.; Ansotequi, R.P.; Tess, M.W.; Olson, B.E.; Roth, M.N.J. 1992. Fecal output of different biological types of beef cattle on native range throughout a productive year. *Proc. Western Section Am. Soc. An. Sci.* 43: 31-34.
- Suwanto, A.; Hala, Y.; Amin, N. 2002. Environmental risk assessment of transgenic cotton in South Sulawesi, Indonesia: Impact on soil microorganisms. Dept. Biology, FMIPA/ SEAMEO- BIOTROP, Bogor; State Univ. Makassar, Makassar, South Sulawesi, Indonesia; Hasannuddin Univ., Makassar, South Sulawesi, Indonesia.
- Tannock, G.W. 1995. *Normal Microflora*. Chapman & Hall.
- Taylor, S.L. 1992. Chemistry and detection of food allergens. *Food Technol.* 46: 146-152.
- Taylor, S.L.; Lemanske, Jr., R.F.; Bush, R.K.; Busse, W.W. 1987. Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann. Allergy*. 59(5): 93-99.
- Trigo, E.J.; Cap, E.J. 2003. The impact of the introduction of transgenic crops in Argentinean agriculture. *AgBioForum*. 6(3): 87-94.
- US FDA. 1994. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption; food additives permitted in feed and drinking water of animals; aminoglycoside 3-phosphotransferase II. *Fed. Regist.* 59(98): 26700-26711.
- Wauchope, R.D.; Estes, T.L.; Allen, R.; Baker, J.L.; Hornsby, A.G.; Jones, R.L.; Richards, R.P.; Gustafson, D.I. 2001. Predicted impact of transgenic, herbicide-tolerant corn on drinking water quality in vulnerable watersheds of the mid-western USA. *Pest Management Science*. 58 : 146-160.
- Weide, R.; Koornneef, M.; Zabel, P. 1989. A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. *Theoretical and Applied Genetics*. 78: 169-172.
- WHO. 1993. Health aspects of marker genes in genetically modified plants. Report of a WHO Workshop. 32 p.
- Williams, G.M.; Kroes, R.; Munro, I.C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31: 117-165.
- Wozniak, C.A.; Owens, L.D. 1994. Native β -glucuronidase activity in sugarbeet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant*. 90: 763-771.