

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-565/07**

**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 01200.003267/07-40 que solicita a liberação comercial do algodão MON 15985 (ou algodão Bollgard® II), a ser apresentado na referida Audiência Pública. Esta contribuição técnica é fornecida na forma do documento “**A biossegurança do algodão geneticamente modificado resistente a insetos MON 15985**”.

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

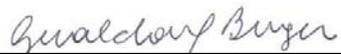
Atenciosamente.

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

**A BIOSSEGURANÇA DO ALGODÃO GENETICAMENTE
MODIFICADO RESISTENTE A INSETOS MON 15985
(PROCESSO Nº 01200.003267/07-40)**

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 RESISTENTE A INSETOS MON 15985

TABELA DE CONTEÚDO

INTRODUÇÃO	4
1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	5
2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EXÓGENAS	6
2.1. Cry2Ab2.....	6
2.2. Cry1Ac	6
2.3. NPTII.....	7
2.4. GUS	7
2.5. AAD.....	8
3. EFICÁCIA.....	8
4. SEGURANÇA ALIMENTAR	9
4.1. Proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2	10
4.2. Proteína NPTII	15
4.3. Proteína GUS.....	17
4.4. Composição nutricional e estudos com animais	18
5. SEGURANÇA AMBIENTAL	20
5.1. Organismos não-alvo	21
5.2. Transferência gênica.....	24
5.3. Potencial como planta daninha.....	27
5.4. Persistência das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 no solo	28
6. MANEJO DE RESISTÊNCIA DE INSETOS	30
6.1. Área de refúgio	30
6.2. Monitoramento da suscetibilidade das pragas.....	32
6.3. Ações educacionais	32
6.4. Plano de mitigação	32
6.5. Refúgio natural para o algodão MON 15985 nos Estados Unidos	33
7. BENEFÍCIOS.....	33
8. CONCLUSÕES	35
9. REFERÊNCIAS	35

TABELAS

Tabela 1. Nível de efeito não observado de preparações microbianas de <i>B. thuringiensis</i> contendo as proteínas Cry2A.	43
Tabela 2. Resumo dos estudos de segurança para as proteínas Cry2Ab e Cry2Aa..	44
Tabela 3. Dados de toxicidade do <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	45
Tabela 4. Resumo dos estudos com a proteína Cry2Ab2 em organismos não-alvo. 46	
Tabela 5. Resumo dos estudos com a proteína Cry1Ac em organismos não-alvo. ..	47

A BIOSSEGURANÇA DO ALGODÃO GENETICAMENTE MODIFICADO RESISTENTE A INSETOS MON 15985

INTRODUÇÃO

A Monsanto desenvolveu o algodão MON 15985 (também designado algodão Bollgard® II), através da técnica de transformação de plantas por aceleração de partículas, para ampliar o espectro de controle de insetos na cultura do algodão. Esse evento é resultante da transformação do algodão Bollgard® (variedade DP50B) para a introdução dos genes *cry2Ab2* (gene que confere resistência a insetos) e *uidA* (gene repórter) em seu genoma. O algodão Bollgard®, por sua vez, foi gerado pela transformação genética da variedade convencional de algodão Coker 312 através da metodologia mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando os genes *cry1Ac* (gene que confere resistência a insetos), *nptII* e *aad* (genes marcadores de seleção). Assim, a transformação do algodão Bollgard® gerou o algodão MON 15985, objeto deste documento, que passou a conter, além dos genes exógenos *cry1Ac*, *nptII* e *aad*, os genes *cry2ab2* e *uidA*. Como o promotor do gene *aad* dirige a expressão apenas em células procarióticas, a proteína AAD não é produzida. Portanto, o algodão MON 15985 expressa as proteínas Cry1Ac, NPTII (também expressas no algodão Bollgard®), Cry2Ab2 e GUS.

O algodão MON 15985 confere controle equivalente ou superior ao proporcionado pelo algodão Bollgard® para as principais pragas da cultura do algodão no Brasil que são o curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*), as lagartas-das-maçãs (*Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea*) e a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), com o controle adicional da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). A combinação das proteínas Cry2Ab2 e Cry1Ac proporciona uma ferramenta adicional para o manejo de resistência das pragas, pois a Cry2A pertence a uma classe de proteína diferente da Cry1Ac. Espera-se que o plantio do algodão MON 15985, em combinação com a adoção de componentes de manejo de resistência de insetos, reduza de forma significativa ou elimine o potencial para aparecimento de insetos resistentes a proteínas inseticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis* na cultura do algodão.

Avaliações agrônomicas e de suscetibilidade a doenças do algodão MON 15985 foram realizadas em diversos estudos de laboratório, casa-de-vegetação e campo conduzidos pela Monsanto e por colaboradores acadêmicos. Os resultados de todos os parâmetros medidos, no algodão MON 15985 encontram-se dentro do intervalo normal de variabilidade esperado para variedades convencionais de algodão, exceto quanto ao controle de insetos, o que era esperado. Nem o material genético inserido, nem as proteínas produzidas resultaram em características não esperadas na planta durante os ensaios.

Os estudos de segurança alimentar e ambiental realizados com o algodão MON 15985 e as proteínas heterólogas nele expressas demonstraram que este algodão resistente a insetos é tão seguro quanto o algodão convencional para o meio ambiente e no uso para alimentação animal e humana. Na avaliação de segurança alimentar e ambiental do algodão MON 15985 apresentada a CTNBio, o algodão Bollgard® foi usado para alguns dos ensaios de avaliação da biossegurança da proteína Cry1Ac. Como o algodão MON 15985 foi gerado pela transformação do algodão Bollgard® com os genes *cry2Ab2* e *uidA*, a proteína Cry1Ac produzida nos dois eventos é a mesma proteína e, portanto, tão segura quanto a que foi caracterizada no evento parental.

Todos os estudos de campo, casa-de-vegetação e laboratório realizados com o algodão MON 15985 demonstraram que ele é comparável ao algodão convencional no que

diz respeito às suas características reprodutivas, agronômicas, de segurança alimentar e ambiental, nutricionais, e outras. Os países onde o algodão MON 15985 está aprovado são: Estados Unidos (2002), África do Sul (2003), Austrália e Nova Zelândia (2002), Canadá (2003), Japão (2002), Coreia do Sul (2003), Filipinas (2003), México (2003), União Europeia (2005) e Índia (2006). Existe, portanto, um histórico de uso seguro do algodão MON 15985 desde 2002, sem que nenhum efeito adverso à saúde humana e animal, e ao meio ambiente tenha sido relatado.

1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

O algodão MON 15985 foi gerado pela inserção do fragmento linearizado do plasmídeo PV-GHBK11 (designado PV-GHBK11L) contendo os genes *cry2Ab2* e *uidA*, além de seus elementos regulatórios, no genoma do algodão Bollgard®. A caracterização molecular do evento de transformação foi realizada utilizando-se técnicas moleculares rotineiramente utilizadas com este objetivo (Doherty et al., 2000ab). As análises de *Southern blot* determinaram o número de insertos (número de *loci* de integração dentro do genoma do algodão), o número de cópias (número de transgenes num *locus* único), a integridade das regiões codificadoras dos genes *cry2Ab2* e *uidA*, a integridade dos cassetes dos genes *cry2Ab2* e *uidA*, e a confirmação da ausência de seqüências derivadas do *backbone* do plasmídeo PV-GHBK11. Adicionalmente, as junções do inserto com o DNA da planta nas extremidades 5' e 3' foram verificadas utilizando-se o método de PCR.

Os resultados demonstram que o algodão MON 15985 contém um inserto do fragmento designado PV-GHBK11L, que contém uma cópia de cada cassete com os genes *cry2Ab2* e *uidA*. A região codificadora do gene *cry2Ab2* e o cassete estão completos. Entretanto, o sítio de restrição após a seqüência de poliadenilação NOS 3' no cassete não está presente. A região codificadora do gene *uidA* e a seqüência de poliadenilação NOS 3' estão completas. Entretanto, a extremidade 5' de 260 pb do promotor melhorado CaMV 35S não está presente no cassete inserido do gene *uidA*. O promotor *e35S* continuou funcional apesar dessa ausência, o que é demonstrado pela produção correta da proteína GUS. O evento não contém nenhuma seqüência detectável do *backbone* derivada do plasmídeo PV-GHBK11. A conclusão é que as proteínas intactas Cry2Ab2 e GUS devem ser produzidas pelo MON 15985 como resultado da integração do fragmento de DNA PV-GHBK11L.

Por sua vez, o algodão Bollgard® (parental do algodão MON 15985) foi produzido através do método de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. A transformação inseriu os genes *cry1Ac*, *nptII* e *aad* no genoma da variedade comercial Coker 312. A inserção desses genes foi confirmada através das técnicas moleculares de *Southern Blot*, PCR, clonagem de cosmídeos, seqüenciamento de DNA e caminhamento no genoma (Reiser et al., 2001). Os resultados demonstraram que o DNA do plasmídeo PV-GHBK04 (contendo os genes *cry1Ac*, *nptII* e *aad*) foi inserido em dois locais do genoma do algodão, separados por DNA genômico da planta. Em um dos locais foi inserido um cassete funcional que possui todos os elementos para a expressão do gene *cry1Ac*. Em associação, existe um segmento truncado que contém uma parte do gene *cry1Ac* e o elemento genético 7S 3'. No segundo local, ocorreu inserção de um fragmento de 242 pb composto de um fragmento do elemento genético 7S 3', que finaliza a transcrição do gene *cry1Ac*.

Em resumo, o algodão MON 15985 contém os genes exógenos *cry1Ac*, *nptII* e *aad* provenientes do parental algodão Bollgard®, e os genes *cry2ab2* e *uidA* inseridos na transformação. Como o promotor do gene *aad* se expressa apenas em células procarióticas,

a proteína AAD não é expressa. Portanto, o algodão MON 15985 expressa as proteínas Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII, e GUS.

2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EXÓGENAS

2.1. Cry2Ab2

A expressão da proteína Cry2Ab2 em componentes alimentares de algodão foi quantificada em amostras coletadas em 1998 e 1999 nos Estados Unidos (Kolwyck et al., 2000a; Kolwyck et al., 2000b). A expressão média da proteína Cry2Ab2 em folhas jovens foi aproximadamente 6mg/g e 24mg/g de tecido (equivalente a ppm) em 1998 e 1999, respectivamente, e foi consistente para todas as regiões amostradas. Os níveis da proteína Cry2Ab2 no caroço de algodão MON 15985 foram maiores que em folhas jovens, aproximadamente 43 mg/g em 1998 e 57 mg/g em 1999, respectivamente. Conforme esperado, a proteína Cry2Ab2 não foi detectada em caroço e folhas jovens do algodão Bollgard® e do algodão convencional. Os níveis da proteína Cry2Ab2 em plantas maduras de algodão MON 15985 foram geralmente menores que em tecidos de folhas e caroço, com médias de 8,8 mg/g e 20,8 mg/g em 1998 e 1999, respectivamente. A proteína Cry2Ab2 não foi detectada em amostras de planta total de algodão Bollgard® e convencional, como esperado. Tanto em 1998 quanto em 1999, quantidades muito baixas (<0,32 mg/g) dessa proteína foram encontradas em pólen do algodão MON 15985.

Experimentos de campo com o algodão MON 15985 foram conduzidos em três locais no Brasil na safra 2005/2006, com o objetivo de gerar amostras para a quantificação da proteína Cry2Ab2 em tecidos de folhas e caroços (Mozaffar e Silvanovich, 2007). Os níveis médios da proteína Cry2Ab2 em folhas e caroços de algodão MON 15985 nos três locais foram, respectivamente, 96 µg/g peso fresco e 230 µg/g peso fresco. No controle convencional DP50, os níveis médios da proteína Cry2Ab2 nos três locais foram abaixo do limite de detecção (LOD) do ensaio (0,26 e 1,1 µg/g peso fresco para folhas e caroços, respectivamente), como esperado.

2.2. Cry1Ac

A média dos níveis de expressão da proteína Cry1Ac foram consistentemente menores que da proteína Cry2Ab2 em todos os tecidos amostrados de algodão MON 15985 e Bollgard®. A expressão da proteína Cry1Ac no algodão MON 15985 foi similar à do algodão Bollgard® tanto em 1998 quanto em 1999 (Kolwyck et al., 2000a; Kolwyck et al., 2000b). Os resultados indicaram que a expressão da proteína Cry1Ac não é alterada pela modificação genética para introdução dos genes *cry2Ab2* e *uidA*. Dados independentes também indicam que a expressão da proteína Cry2Ab2 no algodão MON 15985 não tem efeito significativo sobre a expressão da proteína Cry1Ac, comparado com os níveis de Cry1Ac no algodão Bollgard®. Em 1998, os níveis da proteína Cry1Ac em folhas jovens e caroço (3,35 mg/g) foram um pouco maiores que em 1999 (2,64 mg/g). Durante a safra, a proteína Cry1Ac foi detectada em níveis similares tanto no algodão MON 15985 quanto no algodão Bollgard®. A variação sazonal na expressão da proteína Cry1Ac provavelmente reflete as condições ambientais diferenciadas, como apontado acima para a variação na expressão da proteína Cry2Ab2. No algodão MON 15985, os níveis de expressão da proteína Cry1Ac foram muito menores que os níveis da proteína Cry2Ab2 (1998: 0,17 mg/g; 1999: 0,08 mg/g). Tanto em 1998 quanto em 1999, quantidades muito baixas (0,02 e 0,05

mg/g, respectivamente) dessa proteína foram encontradas em pólen do algodão MON 15985.

Experimentos de campo com o algodão MON 15985 foram conduzidos em três locais no Brasil na safra 2005/2006, com o objetivo de gerar amostras para a quantificação da proteína Cry1Ac em tecidos de folhas e caroços (Mozaffar e Silvanovich, 2007). As médias de expressão da proteína Cry1Ac em folhas e caroços nos três locais para o algodão MON 15985 foram, respectivamente, 7,6 µg/g peso fresco e 1,8 µg/g peso fresco. No controle convencional DP50, os níveis médios da proteína Cry1Ac nos três locais foram abaixo do LOD do ensaio (0,033 e 0,037 µg/g peso fresco para folhas e caroços, respectivamente), como esperado.

2.3. NPTII

A expressão da proteína NPTII no algodão MON 15985 foi semelhante à expressão no algodão Bollgard® (aproximadamente 4,6 - 16,6 mg/g e 4,3 - 15,2 mg/g para o MON 15985 e para o Bollgard®, respectivamente). Os resultados indicaram que assim como para a proteína Cry1Ac, a expressão da proteína NPTII em tecido de caroço e folhas não foi afetada pela inserção do gene *cry2Ab2*. A proteína NPTII não foi analisada para amostras de planta total e pólen (Kolwyck et al., 2000a; Kolwyck et al., 2000b).

Experimentos de campo com o algodão MON 15985 foram conduzidos em três locais no Brasil na safra 2005/2006, com o objetivo de gerar amostras para a quantificação da proteína NPTII em tecidos de folhas e caroços (Mozaffar e Silvanovich, 2007). Nove de dez amostras de folhas do algodão MON 15985 nos três locais puderam ter a proteína NPTII quantificada (média de 5,1 µg/g peso fresco). Somente três de dez amostras de caroços do algodão MON 15985 nos três locais puderam ter a proteína NPTII quantificada (média de 2,5 µg/g peso fresco). Nas demais amostras os níveis estavam abaixo do LOD do ensaio. No controle convencional DP50, os níveis médios da proteína NPTII nos três locais foram abaixo do LOD do ensaio (1,1 e 0,73 µg/g peso fresco para folhas e caroços, respectivamente), como esperado.

2.4. GUS

A proteína GUS foi detectada em altos níveis tanto em folhas jovens (1998: 106 mg/g; 1999: 120 mg/g) quanto em caroços (1998: 58,8 mg/g; 1999: 104 mg/g). Como esperado, a proteína GUS não foi detectada no algodão Bollgard® e no algodão convencional para esse ensaio. A proteína GUS não foi analisada para amostras de planta total e pólen (Kolwyck et al., 2000a; Kolwyck et al., 2000b).

Experimentos de campo com o algodão MON 15985 foram conduzidos em três locais no Brasil na safra 2005/2006, com o objetivo de gerar amostras para a quantificação da proteína GUS em tecidos de folhas e caroços (Mozaffar e Silvanovich, 2007). Os níveis de expressão em folha e caroços da proteína GUS no algodão MON 15985 nos três locais foram, respectivamente, 360 µg/g peso fresco e 130 µg/g peso fresco. No controle convencional DP50, os níveis médios da proteína GUS nos três locais foram abaixo do LOD do ensaio (3,9 e 3,8 µg/g peso fresco para folhas e caroços, respectivamente), como esperado.

2.5. AAD

A proteína AAD não foi detectada em tecido de folhas e caroço de nenhuma das linhagens de algodão amostradas, o que era esperado, pois o gene *aad* está sob controle de um promotor bacteriano que não é ativo em plantas (Kolwyck et al., 2000a; Kolwyck et al., 2000b).

3. EFICÁCIA

Os níveis de expressão das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 encontrados (Kolwyck et al., 2000a; Kolwyck et al., 2000b) são suficientes para propiciar um controle eficaz das pragas alvo durante toda a safra e isso foi comprovado nos estudos de eficácia realizados com o algodão MON 15985. Durante os experimentos em 1998 e 1999 conduzidos nos Estados Unidos, os insetos monitorados foram: *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Pectinophora gossypiella*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera ornithogalli*, *Psuedoplusia includens*, *Trichoplusia ni*, *Lygus lineolaris*, *Anthonomus grandis* e *Aphis spp.* As observações qualitativas de insetos foram realizadas centenas de vezes durante as duas safras, com aproximadamente 41% dos locais apresentando diferenças em insetos alvo, como esperado. Outras observações mostraram que em 24% dos locais não houve diferenças nas populações de insetos não-alvo como em tripes, pulgões, maria-fedida, besouros de plantas, bicudo e ácaros, com tripes sendo o inseto mais observado. Diferenças substanciais na infestação de insetos não-alvo ou severidade não foram observadas entre o algodão MON 15985 e as plantas controle em nenhum dos locais.

Os resultados dos experimentos de 1998 e 1999 nos Estados Unidos mostram claramente que o algodão MON 15985 aumentou a eficácia de controle de insetos alvo em relação ao algodão Bollgard®. O tecido de folha do algodão MON 15985 foi menos atacado por lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*). Como o algodão Bollgard® já produz esse tipo de controle em condições de campo, esses dados demonstram que o algodão MON 15985 continua fornecendo o mesmo controle. A lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*) é outra praga importante da cultura do algodão controlada completamente pelo algodão Bollgard®, não sendo possível incrementar essa eficácia em condições de campo. Entretanto, a eficácia relativa foi avaliada em laboratório em 1998 e os resultados mostraram que o tecido de botão floral do algodão MON 15985 é menos atacado por esta praga, quando comparado com o mesmo tecido de algodão Bollgard®. A lagarta rosada é uma praga importante e os experimentos de campo realizados em 1999 demonstraram que o algodão Bollgard® e o MON 15985 fornecem proteção eficaz contra os danos nos capulhos causados. Esses resultados mostram a eficácia do algodão MON 15985 sobre pragas-chave da cultura do algodão, demonstrando controle semelhante ou superior ao realizado pelo algodão Bollgard®.

Adicionalmente, o algodão MON 15985 demonstrou um espectro de controle mais amplo em relação ao algodão Bollgard®, pois propicia controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e da lagarta mede-palmos (*Pseudoplusia includens*). O algodão Bollgard® tem uma atividade marginal contra essas espécies esporádicas e esse melhor controle propiciado pelo algodão MON 15985 adiciona valor para os cotonicultores. A eficácia de controle de lagarta-do-cartucho em tecidos de folhas foi avaliada em laboratório em 1999, sendo que, embora sua sobrevivência em tecido de folha de algodão MON 15985 não foi significativamente menor que aquela encontrada para o algodão Bollgard®, as lagartas não foram capazes de crescer e se desenvolver. Isso indica que o algodão MON

15985 tem maior eficácia para o controle de lagarta-do-cartucho que o algodão Bollgard®. A eficácia de controle de lagarta mede-palms em tecido de folha foi avaliada em laboratório e a sobrevivência e os pesos corporais dos insetos foram menores em algodão MON 15985, quando comparado ao algodão Bollgard® DP50B e ao algodão convencional DP50.

Os componentes de rendimento foram medidos em diversos locais para avaliar a equivalência com a variedade parental. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre o algodão MON 15985 e o controle DP50B para porcentagem de fibra (peso da fibra como uma porcentagem da fibra mais a semente), índice de semente (peso em gramas de 100 sementes), ou tamanho de capulho (média de peso dos capulhos colhidos de uma dada área na planta). Mesmo sem diferenças significativas no controle do algodão Bollgard® para a retenção de frutos, existe uma tendência de maior retenção para os dois eventos de algodão geneticamente modificado resistente a insetos em relação ao algodão DP50. Esse resultado é esperado, pois há uma maior proteção do algodão Bollgard® e do MON 15985 contra os danos causados por insetos.

No Brasil, a eficácia do algodão MON 15985 no controle do curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*), lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) e lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) foi avaliada em relação ao controle dessas lagartas utilizando inseticidas químicos nas condições de cultivo locais. Os experimentos foram conduzidos em três locais durante a safra 2005/2006. Os resultados mostraram que o algodão MON 15985 é capaz de controlar curuquerê-do-algodoeiro, lagartas-das-maçãs, lagarta rosada e lagarta-do-cartucho, sem a necessidade de aplicações complementares de inseticidas químicos, atingindo níveis de eficácia significativamente superiores quando comparados aos tratamentos inseticidas convencionais nas condições do experimento.

4. SEGURANÇA ALIMENTAR

A segurança alimentar do algodão MON 15985 foi comprovada e os estudos realizados demonstram equivalência substancial deste com o algodão convencional, sendo sua qualidade nutricional similar à encontrada nas variedades convencionais de algodão e também no algodão Bollgard®, que é o parental do algodão MON 15985 na transformação. Além da planta de algodão apresentar um longo histórico de uso seguro na alimentação animal e humana, os resultados das análises de composição com o algodão MON 15985 demonstram que os níveis dos componentes nutricionais e antinutricionais são comparáveis àqueles encontrados no algodão controle parental, estando dentro dos intervalos estabelecidos para as variedades convencionais de algodão. As proteínas Cry2Ab2, Cry1Ac, NPTII e GUS estão presentes em baixos níveis no caroço do algodão MON 15985 e não são mantidas intactas pós-processamento do algodão para consumo humano e animal, procedimento este que geralmente degrada as proteínas. A segurança alimentar das proteínas expressas no algodão MON 15985 foi avaliada pelo histórico de uso seguro dessas ou de proteínas altamente similares, e pela determinação de que não existe potencial alergênico ou tóxico dessas proteínas, além de outros fatores como a ausência de toxicidade oral aguda em mamíferos e a rápida digestibilidade dessas proteínas em fluidos gástrico e intestinal simulados.

4.1. Proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2

A avaliação da segurança das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 incluiu: caracterização das proteínas; ensaios de digestão simulada em fluidos gástrico e intestinal; estudos de toxicidade oral aguda em camundongos; avaliações de bioinformática; estudos dos efeitos das proteínas sobre organismos não-alvo; e estudos nutricionais. Esses estudos foram realizados com as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 produzidas em *E. coli*, garantindo quantidades suficientes das proteínas para os protocolos de avaliação. A equivalência físico-química e funcional das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 produzidas em *E. coli* com as proteínas produzidas na planta foi confirmada.

A baixa toxicidade de misturas microbianas que contêm proteínas Cry para mamíferos foi demonstrada em numerosos estudos de biossegurança (US EPA, 1998; McClintock et al., 1995) conduzidos nos últimos 40 anos. Eles incluem estudos de nutrição subcrônica e crônica, de toxicidade oral aguda, de toxicidade dérmica e inalatória em ratos. Adicionalmente, estudos de irritação primária nos olhos, oral aguda e dérmica aguda foram conduzidos em coelhos, e um estudo dietário subagudo foi conduzido em humanos. Vários desses estudos foram publicados (DeBarjac, et al., 1980; Fisher e Rosner, 1959; Meeusen e Atallah, 1990; Shaddock, 1983; Siegel et al., 1987) e revisados (US EPA, 1998). O potencial para exposição às proteínas Cry na dieta pelo uso de formulações microbianas nas culturas produtoras de alimentos foi reconhecido, mas a conclusão foi de que o risco toxicológico para humanos e outros animais não é esperado (US EPA, 1998; IPCS, 2000). As formulações microbianas de *B. thuringiensis* têm sido utilizadas por décadas em commodities não processadas como uva, tomate, aipo, alface e espinafre, sem que efeitos adversos à saúde humana tenham sido relatados (US EPA, 1998; Leong et al., 1980; Dynamac, 1986). Como consequência da baixa toxicidade de proteínas Cry para mamíferos, todos os produtos microbianos compostos de esporos de *B. thuringiensis* foram eximidos de requerimentos após o registro do primeiro produto em 1960 (concedido pelo FDA), sendo que um amplo programa foi realizado para avaliar toxicidade e infectividade (US EPA, 1998).

Cry1Ac

A proteína Cry1Ac é derivada da bactéria de solo *B. thuringiensis*, que não é uma fonte de alimento e nem essa proteína é substancialmente similar a outras proteínas comestíveis conhecidas. A segurança da proteína Cry1Ac é baseada em: função biológica; inúmeros testes de toxicidade animal com proteínas Cry; histórico de consumo seguro das proteínas Cry por humanos; resultados de estudos de segurança *in vivo* e *in vitro* conduzidos com a proteína Cry1Ac. O modo-de-ação da proteína Cry1Ac é mediado por receptores específicos que existem somente no sistema digestivo de algumas espécies de lepidópteros (English e Slatin, 1992). Os eventos que se seguem à ligação da proteína aos receptores causam a ruptura dos processos digestivos e a morte dos insetos. O trato digestivo de insetos não-alvo, mamíferos, aves e peixes não contêm receptores para a ligação da proteína Cry1Ac ativa. Portanto a proteína Cry1Ac não tem a capacidade de causar qualquer distúrbio nos processos digestivos desses animais (Hofmann et al., 1988ab; McClintock et al., 1995; Siegel, 2001). Com base nos resultados de estudos e nos dados científicos disponíveis na literatura, pode-se concluir que produtos microbianos à base de *B. thuringiensis* não representam risco à saúde humana e a organismos não-alvo, conclusão esta que é válida também para a proteína Cry1Ac expressa no algodão MON 15985.

As avaliações de segurança da proteína Cry1Ac 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 dos estudos que demonstram que a proteína Cry1Ac não é tóxica para mamíferos e, portanto, apresenta uma biossegurança aceitável para humanos.

A proteína Cry1Ac foi produzida através de fermentação em *E. coli* recombinante, produzindo material em quantidade e de qualidade compatíveis para uso nos estudos de segurança (Clayton, 1992) e a determinação da equivalência entre as proteínas produzidas em plantas geneticamente modificadas ou bactérias foi realizada. Determinou-se que o peso molecular, a imunorreatividade, a estrutura de epitopos, a seqüência N-terminal de aminoácidos, a atividade biológica e a ausência de glicosilação foram equivalentes entre as proteínas produzidas em planta e *E. coli*. O estabelecimento dessa equivalência demonstrou que a utilização da proteína Cry1Ac purificada de bactérias transformadas é válida para avaliações sobre a sua segurança quando a mesma proteína é produzida em plantas, como a Cry1Ac produzida no algodão MON 15985 (Sammons, 1993; Sammons et al., 1994).

O potencial de efeitos tóxicos e alergênicos da proteína Cry1Ac em humanos e outros mamíferos foi demonstrado pela sua rápida degradação em um estudo de digestão gástrica *in vitro*, adicionalmente ao conhecimento advindo de literatura especializada sobre a ausência de receptores para a proteína Cry1Ac nesses animais (Ream, 1994a). A taxa de degradação da proteína Cry1Ac foi avaliada separadamente nos fluidos simulados gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 7,5), conforme os níveis recomendados na U.S. Pharmacopeia (1995), por meio de análises de *Western blot* e da bioatividade de insetos. O estudo mostrou que a proteína Cry1Ac e peptídeos se degradam em aproximadamente 30 seg após a exposição ao fluido gástrico e que as condições ácidas do estômago desnaturam a conformação nativa da proteína, facilitando sua rápida degradação. No fluido intestinal, a proteína Cry1Ac foi convertida para uma forma mais resistente a proteases e permaneceu intacta e bioativa por no mínimo 21 h. Esse resultado era esperado, uma vez que o núcleo triptico de proteínas Cry é reconhecidamente resistente à digestão por tripsina. *In vivo*, a proteína Cry1Ac é exposta às condições do estômago antes de entrar no lúmen intestinal. Assim, o baixo pH e a pepsina do estômago estariam digerindo completamente a proteína Cry1Ac ou tornando-a mais suscetível a uma rápida digestão intestinal.

Embora grandes quantidades de proteínas sejam consumidas diariamente na dieta humana, raramente essas proteínas elicitam uma resposta alérgica (Taylor, 1992). Os perfis físico-químicos e de exposição humana da proteína fornecem uma base para a avaliação do potencial de alergenicidade relativa a alérgenos protéicos conhecidos. Assim, aspectos importantes que contribuem para a alergenicidade de proteínas ingeridas oralmente incluem exposição e análise dos fatores que contribuem para essa exposição, como estabilidade à digestão, prevalência no alimento e padrão de consumo (quantidade) para o alimento específico (Metcalf et al., 1996; Kimber et al., 1999). Um parâmetro chave que contribui para a alergenicidade sistêmica de algumas proteínas de alimentos parece ser a estabilidade à digestão gastrointestinal, especialmente a estabilidade a proteases ácidas como a pepsina do estômago (Astwood et al., 1996; Astwood e Fuchs, 1996; Fuchs e Astwood, 1996; Kimber et al., 1999). Alérgenos protéicos importantes são geralmente estáveis à digestão péptica e às condições ácidas do estômago quando alcançam a mucosa intestinal, onde uma resposta imune pode ser iniciada. Como mencionado acima, a avaliação *in vitro* da digestibilidade da proteína Cry1Ac indica que a proteína será rapidamente digerida. 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). A maioria dos alérgenos presente como componente protéico principal em alimentos específicos representa de 2-3% a 80% da proteína total (Fuchs e Astwood, 1996). Isso é verdadeiro para alérgenos em leite, soja e amendoim. Em contraste com essa generalidade para proteínas

alergênicas comuns, a proteína Cry1Ac está presente em baixa quantidade no algodão MON 15985.

É importante também estabelecer que a proteína Cry1Ac não é um alérgeno previamente descrito e, além disso, não compartilha de epitopos potencialmente relevantes em termos de alergenicidade (seqüências de aminoácidos reconhecidas por IgE). A bactéria *B. thuringiensis* e suas formulações utilizadas como pesticidas microbianos não foram descritas como alérgenos sensibilizantes, incluindo a exposição via oral (McClintock et al., 1995). Assim, não há histórico de alergia associada às proteínas Cry de *B. thuringiensis*. Adicionalmente, a seqüência de aminoácidos da proteína Cry1Ac foi comparada com seqüências de proteínas associadas a alergenicidade. A proteína Cry1Ac foi pesquisada para determinar que ela não foi descrita anteriormente como sensibilizadora de alergia e que não compartilha nenhuma similaridade de seqüência de aminoácidos com proteínas reconhecidamente alergênicas. A seqüência de aminoácidos da proteína Cry1Ac foi comparada com seqüências de proteínas associadas a alergenicidade encontradas em bancos de dados genéticos de domínio público, como GenBank, EMBL, PIR e SwissProt (Hileman et al., 2002; Doolittle, 1990). Essa pesquisa revelou que a proteína Cry1Ac não possui nenhuma seqüência similar às seqüências alergênicas depositadas nesses bancos de dados, além de não ter em comum nenhuma seqüência com mais do que sete aminoácidos contíguos idênticos, relevante em termos imunológicos (Astwood, 1995a). Portanto, a proteína Cry1Ac não possui similaridade com alérgenos previamente descritos e não se espera que o consumo de produtos derivados do algodão MON 15985 cause nenhum efeito de alergenicidade em humanos e animais. Os dados e análises descritos acima suportam a conclusão de que a proteína Cry1Ac do algodão MON 15985 não implica em risco alérgico significativo, pois não é derivada de fonte alérgica, não possui similaridade de seqüência imunologicamente relevante com alérgenos conhecidos nem as mesmas características de alérgenos protéicos conhecidos, além de ser prontamente digerida no trato gastrointestinal.

A avaliação de segurança de uma proteína expressa numa cultura geneticamente modificada inclui também comparações estruturais da nova proteína com proteínas associadas a toxicidade ou outros efeitos adversos à saúde. Especificamente, a similaridade de seqüência biologicamente relevante com uma toxina conhecida (ou seja, a seqüência aparentemente derivada de um gene ancestral comum) pode indicar que avaliações toxicológicas adicionais são necessárias. A palavra-chave “toxina” e outras foram utilizadas para selecionar seqüências em bancos de dados públicos (PIR, EMBL, SwissProt e GenBank) e a homologia entre as seqüências encontradas e a proteína Cry1Ac foi determinada. Os resultados mostraram a ausência de similaridade com proteínas reconhecidamente tóxicas (Keck e Mitsky, 1994), o que era esperado. O resultado dessa comparação é mais um argumento que confirma a segurança alimentar da proteína Cry1Ac, mostrando que ela não apresenta risco de toxicidade a organismos não-alvo.

No estudo de toxicidade aguda com a proteína Cry1Ac, esta foi administrada oralmente a camundongos albinos (Naylor, 1993a). A maior dose administrada (4.200 mg de Cry1Ac/kg de peso corporal) foi selecionada com base no conceito de dose máxima de risco. Duas doses menores (1.000 mg/kg e 500 mg/kg peso corporal) também foram incluídas. Não houve evidência de toxicidade, mesmo utilizando a dose mais alta da proteína no ensaio. Não houve observação de sinais clínicos anormais em nenhum dos animais durante o estudo. Não houve diferença estatística significativa 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. O estudo realizado com ratos durante um mês também não mostrou efeitos da proteína Cry1Ac sobre os animais (Naylor, 1993b).

Cry2Ab2

A proteína Cry2Ab2 é derivada da bactéria de solo *B. thuringiensis*, que não é uma fonte de alimento e essa proteína não é substancialmente similar a outras proteínas comestíveis conhecidas. Além disso, existe um histórico seguro de exposição na dieta a resíduos de *B. thuringiensis* em commodities agrícolas não processadas, como mencionado anteriormente neste documento. A segurança da proteína Cry2Ab2, assim como da proteína Cry1Ac, é baseada em: função biológica; inúmeros testes de toxicidade animal com proteínas Cry, incluindo a classe Cry2A altamente homóloga; histórico de consumo seguro das proteínas Cry por humanos; resultados de estudos de segurança *in vivo* e *in vitro* conduzidos com a proteína Cry2Ab2.

A proteína Cry2Ab2 produzida no algodão MON 15985 apresenta seqüência de aminoácidos 88% idêntica à proteína Cry2Aa produzida pela bactéria *B. thuringiensis*. À semelhança da proteína Cry1Ac, a proteína Cry2Ab2 exibe um modo-de-ação complexo e com múltiplos componentes (English e Slatin, 1992; Höfte e Whitely, 1989; English et al., 1994; Sims, 1997). Os mamíferos não são suscetíveis às proteínas Cry, incluindo a Cry2Ab2, o que é explicado em parte pelas condições requeridas para que as etapas do modo-de-ação ocorram. Receptores para as proteínas Cry não foram identificados em células intestinais de mamíferos como ratos e coelhos (Sacchi et al., 1986; Hofmann et al., 1988ab). Os resultados de alguns estudos foram publicados em revisões científicas (Ignoffo, 1973; Shadduck et al., 1983; Siegel e Shadduck, 1989), e suportam as considerações sobre o histórico de uso seguro das formulações de *B. thuringiensis*. Com base nos resultados de estudos e nos dados científicos disponíveis na literatura, pode-se concluir que produtos microbianos à base de *B. thuringiensis* não significam risco à saúde humana e de organismos não-alvo, conclusão esta que é válida também para a proteína Cry2Ab2 expressa no algodão MON 15985.

A proteína Cry2Aa exibe um alto grau de similaridade de aminoácidos (92%) em relação à proteína Cry2Ab2 produzida no algodão MON 15985 (Crickmore et al., 1998; Schnepf et al., 1998). As duas proteínas têm reação cruzada forte com anticorpos monoclonais ou policlonais específicos de cada proteína. As proteínas Cry2A também têm espectro de atividade similar contra pragas lepidópteras, incluindo as que atacam o algodão e o milho. Os produtos microbianos derivados de *B. thuringiensis* contendo a proteína Cry2A foram comercializados nos Estados Unidos em 1986 para controlar pragas lepidópteras em várias culturas (US EPA, 1986). Assim, os estudos de biossegurança conduzidos com esses produtos são relevantes para a avaliação de segurança da proteína Cry2Ab2. Como mostrado na Tabela 1, as proteínas Cry2A como componentes de vários produtos microbianos de *B. thuringiensis* foram testadas em estudos de toxicidade aguda, subcrônica e crônica com ratos, coelhos, ovelhas e humanos. Nesses estudos, as doses mais altas administradas aos animais não produziram efeitos observáveis, o que é consistente com a ausência de toxicidade de outras proteínas Cry quando oferecidas em altas doses na dieta de mamíferos.

As avaliações de segurança da proteína Cry2Ab2 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. A Tabela 2 apresenta uma lista dos estudos realizados com a proteína Cry2Ab2 e os estudos equivalentes realizados com a proteína Cry2Aa pela Monsanto. Os resultados desses estudos são mostrados nos parágrafos a seguir e demonstram que a proteína Cry2Ab2 não é tóxica para mamíferos e, portanto, apresenta uma biossegurança aceitável para humanos. Além disso, as conclusões dos

estudos com a proteína Cry2Ab2 corroboram os dados que confirmam a segurança da proteína Cry2Aa, que é muito similar à proteína Cry2Ab2.

Da mesma forma que a proteína Cry1Ac, a proteína Cry2Ab2 foi produzida em *E. coli* e caracterizada quanto à sua equivalência com a mesma proteína produzida no algodão MON 15985 para que pudesse ser utilizada nos estudos de biossegurança. Um dos estudos foi o de digestão simulada, realizado para avaliar a digestibilidade *in vitro* da proteína Cry2Ab2 (peso molecular de aproximadamente 63 kDa) utilizando fluido gástrico simulado (SGF) e fluido intestinal simulado (SIF) como modelos de digestão em mamíferos. A proteína Cry2Ab2 foi incubada em SGF e SIF a 37°C por até 2 h e 24 h, respectivamente. A estabilidade da proteína foi avaliada em tempos específicos utilizando os métodos SDS-PAGE (limite de detecção, 10 ng; limite de resolução, ≥ 2 kDa) e *immunoblotting* (limite de detecção, 5 ng; limite de resolução, ≥ 2 kDa) para cada incubação. Além disso, o ensaio funcional com o inseto alvo *Helicoverpa zea* (EC₅₀) foi utilizado para avaliar a atividade funcional remanescente da proteína Cry2Ab2 após a incubação. A análise das incubações em SGF por SDS-PAGE mostrou que, em 15 seg, mais de 98% da proteína Cry2Ab2 foi digerida e que fragmentos ≥ 2 kDa da proteína original não foram encontrados. A análise das incubações em SIF por *immunoblot* mostrou que um fragmento da proteína Cry2Ab2 relativamente estável (aproximadamente 50 kDa) foi produzido em 1 min e observado por no mínimo 24 h. A classe das proteínas Cry1, Cry2 e Cry3 produz fragmentos do núcleo trípico estáveis quando essas proteínas são incubadas em SIF. Essas observações foram corroboradas pelos bioensaios com insetos alvo, mostrando a rápida perda de atividade da proteína Cry2Ab2 em SGF e atividade estável em SIF. Essa avaliação da digestibilidade da proteína Cry2Ab2 *in vitro* indica que ela é prontamente digerida no estômago de mamíferos, restando pouco a ser digerido no intestino, o que confirma sua biossegurança alimentar para humanos e outros animais.

A seqüência de aminoácidos da proteína Cry2Ab2 foi comparada com seqüências de proteínas associadas a alergenicidade. Bancos de dados com seqüências de proteínas associadas a alergias e doença celíaca montados com dados disponíveis (GenBank, EMBL, PIR e SwissProt) e da literatura atual foram utilizados. A palavra-chave “alérgeno” e outras foram utilizadas para selecionar seqüências alergênicas nesses bancos de dados. Alérgenos únicos adicionais encontrados na literatura foram também adicionados, criando um banco de dados atualizado contendo 567 seqüências únicas de proteínas. A seqüência de aminoácidos deduzida da proteína Cry2Ab2 foi comparada a essas seqüências e mostrou que não compartilha de similaridade com alérgenos depositados nesses bancos de dados, além de não compartilhar de seqüências de aminoácidos com potencial imunologicamente relevante maior que sete aminoácidos contíguos idênticos. A proteína Cry2Aa também não compartilha nenhuma similaridade de seqüência significativa com seqüências de alérgenos conhecidos. Esses resultados suportam a conclusão de que a proteína Cry2Ab2 do algodão MON 15985 não implica em risco alergênico significativo, pois não é derivada de fonte alergênica, não possui similaridade de seqüência imunologicamente relevante com alérgenos conhecidos nem as mesmas características de alérgenos protéicos conhecidos, além de ser prontamente digerida no trato gastrointestinal.

A avaliação de segurança de uma proteína expressa numa cultura geneticamente modificada inclui também comparações estruturais da nova proteína com proteínas associadas a toxicidade ou outros efeitos adversos à saúde. Um banco de dados contendo 4677 seqüências de proteínas associadas a toxicidade foi montado a partir de bancos de dados publicamente disponíveis (GenBank, EMBL, PIR e SwissProt). A seqüência deduzida de aminoácidos da proteína Cry2Ab2 foi comparada com as seqüências depositadas nesse banco de dados. Adicionalmente, a proteína Cry2Ab2 foi comparada com todas as

seqüências de proteínas em bancos de dados publicamente disponíveis para pesquisar sobre uma similaridade estrutural com proteínas farmacologicamente ativas. Além das similaridades esperadas com outras proteínas Cry de *B. thuringiensis* e espécies relacionadas, similaridades estruturais significativas com outras toxinas não foram observadas. Os resultados indicaram que a proteína Cry2Ab2 não é similar a nenhuma toxina ou outra proteína relevante de potencial tóxico para a saúde humana e animal. Da mesma forma, a proteína Cry2Aa não compartilha de similaridade de seqüência significativa com proteínas tóxicas relevantes para a saúde humana e animal.

Outra maneira de avaliar se uma proteína apresenta toxicidade para animais é realizando experimentos que administrem essa proteína diretamente em alta dose. A administração da proteína purificada por via oral aguda é considerada apropriada para confirmar a segurança da proteína Cry2Ab2, pois proteínas que são tóxicas agem tipicamente por mecanismos de via aguda (Sjoblod et al., 1992). Camundongos machos e fêmeas receberam doses orais da proteína Cry2Ab2 de 67,3, 359 ou 1.450 mg/kg de peso corporal, respectivamente (Naylor, 1996). Efeitos adversos que fossem atribuídos à administração da proteína Cry2Ab2 nas doses utilizadas não foram observados nos animais. O nível de efeito não observado (NOEL) da proteína Cry2Ab2 administrada em dose aguda por gavagem ao animal foi considerado pelo menos 1.450 mg/kg, ou seja, a dose mais alta testada. A dose mais alta administrada representa a dose mais alta possível com base na capacidade do sistema teste e na solubilidade da proteína, por isso o NOEL real para a proteína Cry2Ab2 é maior. Esse NOEL é comparável e consistente com aquele determinado como 4.011 mg/kg para a proteína Cry2Aa e outras proteínas Cry na classe Cry2A (Tabela 1).

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, 1988ab). 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 15985 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 (US FDA, 1994). Essa proteína é degradada no sistema gastrintestinal 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 15985 que expressam a proteína NPTII apresentem 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.

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 tanto no algodão MON 15985 quanto no algodão Bollgard® (parental usado na transformação).

A seqüência de aminoácidos da proteína NPTII foi comparada com seqüências de proteínas associadas a alergenicidade encontradas em bancos de dados de domínio público (GenBank, EMBL, PIR e SwissProt) (Hileman et al., 2002; Doolittle, 1990). Dados sobre a proteína NPTII, resultantes da análise em um banco de dados de 567 seqüências protéicas associadas com alergias e doença celíaca, indicaram que essa proteína não possui similaridade com as seqüências alergênicas (Astwood, 1995b; Hileman e Astwood, 2000a). Portanto, a proteína NPTII não possui similaridade com alergênicos previamente descritos e

não se espera que o consumo de produtos derivados do algodão MON 15985 cause nenhum efeito de alergenicidade em humanos e animais. Além disso, não há histórico de alergia associada à proteína NPTII. Os resultados suportam a conclusão de que a proteína NPTII do algodão MON 15985 não implica em risco alergênico significativo, pois não é derivada de fonte alergênica, não possui similaridade de seqüência imunologicamente relevante com alérgenos conhecidos e não possui as mesmas características de alérgenos protéicos conhecidos, além de ser prontamente digerida no trato gastrointestinal.

A comparação do grau de similaridade de aminoácidos da proteína NPTII com proteínas tóxicas foi feita com base em seqüências disponíveis em bancos de dados de domínio público (PIR, EMBL, SwissProt e GenBank). Essa proteína exógena produzida no algodão não mostrou nenhuma homologia com toxinas que pudesse levantar preocupações com relação à segurança alimentar do algodão MON 15985. 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 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 15985 e no parental da transformação algodão Bollgard®. Todos os animais foram sacrificados no sétimo dia pós-dosagem e submetidos à necropsia, sendo que nenhum efeito patológico foi observado.

4.3. Proteína GUS

O histórico de uso seguro da proteína GUS é amplo, e a exposição de humanos a essa proteína é comum nas células epiteliais do intestino e microflora intestinal através da exposição a bactérias e alimentos que contêm a GUS, sem que efeitos adversos tenham sido observados (Gilissen et al., 1998). A atividade da proteína GUS foi detectada em mais de 50 espécies de plantas, em vários tecidos incluindo embriões, frutos, casca de semente e endosperma (Hu et al., 1990). Essas espécies incluem várias fontes de alimento para humanos, como batata, maçã, amêndoa, aveia e beterraba (Schulz e Weissenbock, 1987; Hodal et al., 1992; Wozniak e Owens, 1994). A proteína GUS está também presente em carne e em várias espécies invertebradas como nematóides, moluscos, cobras e insetos. Mesmo quando ingerida em alimentos não processados como maçãs, a proteína GUS não causa efeitos adversos à saúde humana. Da mesma forma, metabólitos da atividade GUS em *E. coli* não são tóxicos (Gilissen et al., 1998).

A enzima GUS derivada de *E. coli* e expressa no algodão MON 15985 é 99,8% homóloga e funcionalmente equivalente à enzima GUS de *E. coli* naturalmente presente no sistema digestivo humano. A porcentagem de 0,2% de não-homologia é devido à adição de um sítio de restrição no início da seqüência para o uso em transformação de plantas. Portanto, a proteína GUS do algodão MON 15985 é substancialmente similar às proteínas comestíveis.

Um parâmetro chave que contribui para a alergenicidade sistêmica de algumas proteínas de alimentos parece ser a estabilidade à digestão gastrointestinal, especialmente a estabilidade a proteases ácidas como a pepsina do estômago (Astwood e Fuchs, 1996; Fuchs e Astwood, 1996). A proteína GUS degrada rapidamente quando adicionada a fluidos gástrico e intestinal simulados (SGF e SIF), que simulam a digestão humana, o que foi

avaliado tanto através de análises de *Western blot* quanto de ensaios de atividade enzimática. Em 15 seg de exposição ao SGF não foi possível detectar a proteína GUS pelos dois métodos citados. Após 2 h em SIF, uma banda (fraca) foi observada no *Western blot* e aproximadamente 91% da atividade enzimática da proteína foi perdida. Com base nesses resultados, pode-se concluir que a proteína GUS, se ingerida por humanos, será prontamente degradada no trato digestivo (Fuchs e Astwood, 1996). Entretanto, qualquer exposição humana adicional a essa proteína oriunda de produtos derivados do algodão MON 15985 não é esperada, uma vez que o processamento remove ou desnatura essa e demais proteínas.

O gene *uidA* não foi obtido de uma fonte reconhecidamente alergênica, uma vez que a bactéria *E. coli* (Jefferson et al., 1986) é prevalente no trato gastrintestinal de humanos e animais. Um banco de dados com seqüências de proteínas associadas com alergia e doença celíaca foi montado a partir de bancos de dados de domínio público (GenBank, EMBL, PIR e SwissProt) e da literatura atual. Alérgenos únicos foram também adicionados, criando um banco de dados atualizado contendo 567 seqüências únicas de proteínas. A seqüência de aminoácidos da proteína GUS foi comparada a essas seqüências e mostrou que ela não compartilha de similaridade com os alérgenos depositados nos bancos de dados. 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; Taylor et al., 1992; Fuchs e Astwood, 1996). Em contraste com essa generalidade para proteínas alergênicas comuns, a proteína GUS está presente em baixa quantidade no algodão MON 15985.

Um banco de dados com seqüências de proteínas associadas a toxicidade foi montado a partir de bancos de dados públicos (GenBank, EMBL, PIR e SwissProt). A palavra-chave "toxina" e outras foram utilizadas para selecionar 4677 seqüências tóxicas de bancos de dados públicos. A seqüência deduzida da proteína GUS foi comparada com as seqüências depositadas nesse banco de dados. Adicionalmente, a seqüência da proteína GUS foi comparada com todas as seqüências de proteínas em bancos de dados publicamente disponíveis para pesquisar sobre uma similaridade estrutural a proteínas farmacologicamente ativas. A proteína GUS tem alguma similaridade de seqüência com proteínas homólogas de *Escherichia coli* e outras glucuronidases, como esperado. Essas proteínas não são descritas como toxinas relevantes para a saúde humana e nenhuma outra homologia estrutural foi observada.

A proteína GUS utilizada no estudo de toxicidade oral aguda foi produzida e purificada em *E. coli*, e caracterizada quanto à sua equivalência com a proteína produzida na planta. No estudo, a proteína foi administrada por gavagem a camundongos nas doses 0, 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal (Naylor, 1992). Efeitos adversos relacionados ao tratamento não foram observados em animais que receberam a proteína GUS até a dose real de 69 mg/kg, a mais alta dose testada. Não houve diferença em peso corporal, peso corporal cumulativo ou consumo de alimentos entre os grupos controle e os grupos tratados com a proteína GUS. Os resultados demonstraram que a proteína GUS não é tóxica para camundongos. Estudos nutricionais prévios utilizando amplas doses de *E. coli* linhagem K12 contendo a proteína GUS em humanos e animais também demonstraram a segurança da proteína GUS, sem a observação de efeitos adversos (Flamm, 1993).

4.4. 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.

É importante lembrar que as proteínas Cry produzidas pelo *B. thuringiensis* já foram extensivamente testadas e apresentam um histórico de uso seguro de mais de 40 anos (Mcclintock et al., 1995; Betz et al., 2000). Coletivamente, esses estudos com as proteínas Cry demonstraram a ausência de toxicidade dérmica e oral (aguda, subcrônica ou crônica) associadas com pesticidas microbianos, incluindo as formulações comerciais que contêm essas proteínas. Na publicação de Joung e Côté (2000) aparece um resumo dos estudos de laboratório para avaliação da toxicidade do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* em peixes, aves e mamíferos, demonstrando a ausência de efeitos das proteínas Cry sobre esses animais (Tabela 3).

Os estudos de avaliação de segurança alimentar e nutricional com o algodão MON 15985 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 sua contra-parte 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.

Os resultados do estudo que avaliou a composição do algodão MON 15985 foram compilados e publicados por Hamilton et al. (2004). No estudo de composição foram analisados os componentes bromatológicos (proteína, gorduras, cinzas, carboidratos, calorias e umidade), fibras (cruas, FDA e FDN), perfil de aminoácidos, perfil de ácidos graxos, minerais, gossipol (livre e total), aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) e vitamina E. Os resultados de estudos nutricionais com animais foram também mostrados para reforçar as conclusões sobre a segurança alimentar do algodão MON 15985 usado em ração animal. Diferenças significativas entre a composição do algodão MON 15985 e do algodão convencional não foram observadas. Todos os componentes determinados para o algodão MON 15985 ficaram dentro do intervalo de tolerância de 99% para variedades comerciais ou dentro dos intervalos publicados na literatura (www.cropcomposition.org). Em resumo, a expressão das proteínas Cry2Ab2, Cry1Ac, NPTII e GUS no algodão MON 15985 não alterou a composição da semente e do óleo processados, assim como a qualidade do óleo do algodão. Tang et al. (2006) também avaliaram os efeitos da composição nutricional do algodão MON 15985 em comparação com o algodão Bollgard® e com uma variedade convencional. Através de análises químicas foram medidos: proteína crua, fibra crua, gorduras, umidade, cinzas, aminoácidos, alguns minerais e antinutrientes (gossipol livre e total e taninos). Os resultados mostraram a equivalência composicional entre os genótipos testados, corroborando os resultados encontrados nos estudos realizados pela Monsanto. Assim, os resultados de composição demonstraram que o algodão MON 15985 é equivalente e tão seguro quanto o algodão convencional (Hamilton et al., 2004).

A avaliação da composição do algodão MON 15985 comparada com a variedade controle convencional DP50, que possui *background* genético similar, e com nove referências convencionais foi realizada com material vegetal produzido nas condições do agroecossistema brasileiro na safra 2005/2006 (Lundry et al., 2007). As amostras foram coletadas em ensaios realizados em três locais representativos da cultura do algodão no Brasil. Os caroços de algodão foram analisados para componentes bromatológicos (cinzas, carboidratos, gorduras, umidade e proteínas) e gossipol (livre e total) utilizando métodos internacionalmente validados (AOAC, 2005abcd; AOAC, 1998; Bradstreet, 1965; Kalthoff e Sandell, 1948). Para cada componente, o algodão MON 15985 foi comparado com o controle DP50 e as referências convencionais. Análises estatísticas descritivas mostraram que os valores médios e os intervalos obtidos para proteínas, gorduras, cinzas, umidade, carboidratos e gossipol (livre e total) para o algodão MON 15985 foram similares aos valores para o algodão controle DP50 e as referências convencionais. Esses valores também foram comparáveis aos valores publicados na literatura e valores históricos para caroço de algodão. As únicas exceções foram oito componentes de análises individuais de um total de 70 analisados entre todos os locais. Dois valores individuais de carboidratos, dois de gorduras, dois de gossipol total e dois de gossipol livre ficaram fora do intervalo de valores relatado para algodão convencional. Entretanto, esses valores foram pequenos em magnitude quando comparados aos valores das referências e da literatura, e não foram consistentes entre os locais ou entre as repetições. Adicionalmente, a maioria (oito de 10) dos valores individuais desses componentes caiu dentro dos intervalos da literatura e de referências, sendo que as diferenças foram consideradas dentro da variabilidade natural para caroço de algodão e não biologicamente relevantes. Com base nesses resultados, as amostras coletadas no Brasil corroboram a conclusão de que o caroço do algodão MON 15985 é composicionalmente equivalente em termos de componentes bromatológicos e gossipol (livre e total) às variedades convencionais de algodão.

A equivalência nutricional do algodão MON 15985 com variedades convencionais de algodão foi avaliada em vacas leiteiras, bagres, codornas e frangos de corte (Hamilton et al., 2004; Hartnell et al., 2001; Castillo et al., 2001; Castillo et al., 2004; Li e Robinson, 2000; Mandal et al., 2004). Basicamente, esses estudos nutricionais mostraram que o algodão MON 15985 é tão seguro, nutritivo e saudável quanto o algodão convencional para uso como ração e alimento animal. Além disso, a margem de segurança da exposição do algodão MON 15985 é ampla, mostrando que o produto é seguro para animais de criação. No que se refere à segurança alimentar, o algodão MON 15985 é considerado substancialmente equivalente ao algodão convencional nos seus componentes nutricionais e tem se mostrado seguro para o uso na alimentação animal e humana, sem que efeitos adversos tenham sido detectados desde a sua liberação comercial nos Estados Unidos em 2002.

5. SEGURANÇA AMBIENTAL

Uma grande quantidade de informação está disponível sobre a segurança ambiental para organismos não-alvo de formulações microbianas de *B. thuringiensis* contendo proteínas Cry. As proteínas Cry1A são extremamente seletivas para os insetos lepidópteros (Dulmage, 1981; Klausner, 1984; Aronson et al., 1986; Macintosh et al., 1990; Whiteley e Schnepf, 1998), ligando-se a receptores específicos do intestino médio desses insetos (Hofmann et al., 1988ab; Van Rie et al., 1990), sem apresentar efeitos deletérios sobre insetos benéficos e não-alvo, entre os quais se incluem predadores, parasitóides, polinizadores e outros (Cantwell et al., 1972; Krieg e Langenbruch, 1981; Flexner et al.,

1986; US EPA, 1988). A proteína Cry2Ab2, por sua vez, tem um alto grau de similaridade de seqüência com a proteína Cry2Aa produzida em produtos comerciais *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, os quais têm um longo histórico de segurança ambiental (US EPA, 1998). Para confirmar essa segurança das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 no algodão MON 15985, estudos foram conduzidos com organismos indicadores não-alvo como aves, peixes e espécies invertebradas benéficas.

A segurança ambiental do algodão MON 15985 está provada e ele é considerado seguro para organismos não-alvo. Estudos e literatura sobre o fluxo gênico e sobre a persistência das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 no solo comprovam a segurança do algodão MON 15985 no meio ambiente e para os organismos que nele vivem. É importante reforçar que os genes *cry1Ac* e *cry2Ab2* presentes no algodão MON 15985 são oriundos de um organismo abundante em praticamente todos os tipos de solo e que a exposição a esse organismo jamais ocasionou efeitos adversos sobre o meio ambiente. Um grupo de especialistas avaliou vários aspectos da segurança da proteína NPTII produzida em plantas geneticamente modificadas e concluiu que não há razões para preocupações relativas à segurança dessa proteína para o meio ambiente (WHO, 1993), além dela não possuir propriedades pesticidas ou inseticidas. A proteína GUS também não possui efeito inseticida e não há qualquer evidência de que esta proteína seja perigosa ao meio ambiente e organismos que nele vivem (Miki e McHugh, 2004).

5.1. Organismos não-alvo

Estudos foram conduzidos para determinar se espécies de insetos não-alvo ou outros invertebrados terrestres são suscetíveis à proteína Cry2Ab2. A atividade biológica da proteína Cry2Ab2 foi avaliada em minhocas, assim como em cinco espécies de invertebrados terrestres benéficos: adultos e larvas de abelhas melíferas (*Apis mellifera*), colêmbolos (*Folsomia candida*), lixeiro (*Chrysomera carnea*), joaninhas (*Hippodamia convergens*), vespas parasitóides (*Nasonia vitripennis*) e minhocas (*Eisenia fetida*) (Tabela 4). Os resultados indicaram que a proteína Cry2Ab2 não impõe risco para esses organismos benéficos não-alvo. Efeitos adversos não foram observados na máxima concentração prevista no meio ambiente para a qual esses organismos possam ser expostos. Na maioria dos estudos, a concentração de efeito não observado (NOEC) excedeu a máxima concentração ambiental prevista por 10- a mais de 100- vezes, demonstrando a ampla margem de segurança da proteína Cry2Ab2 para esses organismos. As observações de campo de populações não-alvo conduzidas durante numerosos experimentos com o algodão MON 15985 também suportam essa conclusão.

O potencial de proteínas Cry1 e Cry2 causar efeitos em lepidópteros não-alvo é bem conhecido, incluindo as lagartas de borboletas Monarca, assim como lepidópteros ameaçados ou em extinção. As plantas que expressam proteínas Cry não impõem risco a lepidópteros ameaçados ou em extinção, e o risco é mínimo para outros lepidópteros não-alvo, pois tais espécies não são expostas a quantidades significativas das proteínas. Nenhum desses lepidópteros se alimenta deliberadamente em plantas de algodão ou em tecidos dessas plantas. Conseqüentemente, a única rota de exposição possível à proteína Cry2Ab2 para essas espécies é através do pólen de algodão MON 15985 que se deposite sobre a planta hospedeira desses insetos, seguida de consumo inadvertido pela lagarta. Isso requer que a espécie sensível à proteína Cry2Ab2 esteja no estágio de lagarta durante um período curto de 7-10 dias da liberação de pólen, e que as plantas hospedeiras estejam próximas o suficiente dos campos de algodão MON 15985 para que o pólen seja depositado nelas. Como não se considera que a cultura do algodão seja polinizada pelo vento, a

deposição de pólen em plantas hospedeiras é improvável. Adicionalmente, os níveis da proteína Cry2Ab2 em pólen são muito baixos e somente uma deposição substancial de pólen poderia causar efeitos adversos até mesmo para espécies altamente sensíveis à proteína Cry2Ab2.

A especificidade da proteína Cry1Ac baseia-se no modo-de-ação mediado por receptores encontrados em algumas espécies da ordem Lepidoptera. Dois estudos foram realizados utilizando a proteína Cry1Ac para confirmar essa especificidade. O primeiro estudo avaliou a especificidade da proteína Cry1Ac utilizando 18 pragas importantes, que representavam seis ordens de insetos e uma espécie de ácaro (MacIntosh et al., 1990). A proteína Cry1Ac foi testada em uma concentração de 50 µg/ml. As únicas espécies suscetíveis a essa concentração da proteína Cry1Ac foram as sete espécies da ordem Lepidoptera. O segundo estudo utilizou a proteína Cry1Ac purificada e quatro espécies de insetos-alvo, seis insetos não-alvo e quatro insetos benéficos foram testadas. As quatro espécies alvo e as seis espécies não-alvo foram testadas usando uma dieta com uma dose de 100 µg/ml da proteína Cry1Ac purificada (mil vezes mais alta do que foi usado para a *H. virescens*, o inseto-alvo mais sensível no primeiro estudo) e 50 µg/ml da proteína Cry1Ac resistente à tripsina. As quatro espécies benéficas (*A. mellifera*, *N. vitripennis*, *C. carnea* e *H. convergens*) foram testadas com uma concentração de 20 µg/ml da proteína na dieta, que representa mais de cem vezes a concentração de proteína no pólen e no néctar de algodão Bollgard® cultivado no campo. Das 14 espécies testadas, somente as quatro espécies Lepidoptera foram suscetíveis à proteína Cry1Ac, confirmando os resultados do primeiro estudo. Tanto a proteína inteira como a proteína truncada (fragmento resistente à tripsina) mostraram o mesmo espectro de atividade específico para algumas espécies de lepidópteros (Sims, 1995).

Os efeitos da proteína Cry1Ac sobre organismos não-alvo e benéficos foram estudados para comprovação da segurança ambiental da proteína para essas populações. Os estudos verificaram efeitos sobre *Hippodamia convergens* (joaninhas), *Nasonia vitripennis* (parasitóide himenóptera), *Crysopa carnea* (lixeiro), *Apis mellifera* (abelhas), *Folsomia candida* e *Xenylla grisea* (organismos de solo) e camundongos albinos. Tecidos do algodão Bollgard® (parental do algodão MON 15985) foram utilizados para verificar o efeito da proteína Cry1Ac sobre *Apis mellifera* (abelhas), *Folsomia candida* e *Oppia nitens* (organismos de solo) e codornas (Northern Bobwhite). Estudos de campo também foram realizados para a avaliação do efeito do cultivo do algodão Bollgard® sobre populações de colêmbolas e minhocas (organismos de solo) e microbiotas (bactérias, fungos e algas). Um estudo avaliou a toxicidade oral aguda da proteína Cry1Ac purificada para camundongos albinos, usados como representantes dos mamíferos. Os resultados demonstram a segurança da proteína Cry1Ac para os organismos não-alvo testados (Tabela 5).

Comunidades de organismos predadores de solo têm potencial para serem afetadas pela proteína Cry1Ac do algodão MON 15985 e do algodão Bollgard®, assim como pela possível redução do uso de inseticidas nessas culturas geneticamente modificadas (Torres e Ruberson, 2007). Para avaliar esses efeitos sobre tais comunidades de organismos não-alvo, a contagem desses artrópodos de solo foi realizada e demonstrou-se não haver diferenças entre as comunidades de solo dos dois tipos de algodão, o geneticamente modificado resistente a insetos e o convencional. Os mesmos autores (Torres e Ruberson, 2006a) avaliaram a dinâmica temporal e espacial do comportamento de ovoposição de pragas do algodão (*Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea*) e de três predadores (*Geocoris punctipes*, *Chrysoperla rufilabris* e *Micromus* sp.), comparando o algodão geneticamente modificado resistente a insetos com o algodão convencional de 2002 a 2004, em plantios pós-comerciais. O algodão geneticamente modificado resistente a insetos não exerce efeito

adverso significativo nos padrões espaciais ou temporais de ovoposição dos predadores, indicando ausência de alteração do comportamento de ovoposição das fêmeas nas estruturas da planta de algodão após quase 10 anos de cultivo de algodão geneticamente modificado resistente a insetos. Esse resultado foi corroborado por outro estudo sobre a interação do algodão geneticamente modificado resistente a insetos com o inseto omnívoro *Geocoris punctipes* realizado durante 2003 e 2004 (Torres e Ruberson, 2006b) que mostrou a segurança da proteína Cry1Ac e do algodão geneticamente modificado resistente a insetos para organismos não-alvo importantes no controle biológico e sua utilidade como ferramenta para um manejo integrado de pragas eficaz, podendo ser extrapolado para o algodão MON 15985, uma vez que a interação entre a expressão das duas proteínas é aditiva.

Estudos de campo conduzidos de 2000 a 2002 nos Estados Unidos compararam populações de insetos que vivem nas folhas de algodão Bollgard® (que expressa a proteína Cry1Ac) e algodão convencional (Head et al., 2005). Os artrópodos coletados incluíram as espécies alvo (mariposas heliothine e *Spodoptera* spp.), não-alvo (maria-fedida e besouros de plantas) e inimigos naturais generalistas (*Geocoris* spp., *Orius* spp., *Solenopsis invicta*, joaninhas e aranhas). A proteína Cry1Ac não causou impactos adversos significativos sobre as populações estudadas de insetos não-alvo e, em comparação ao algodão convencional tratado com inseticidas, o algodão Bollgard® suporta populações de inimigos naturais maiores com impactos positivos no controle biológico. A segurança do algodão Bollgard® para organismos não-alvo foi também avaliada na China (Wu et al., 2006). Um monitoramento de campo da abundância de predadores e pragas foi realizado entre 1998 e 2004, e os resultados indicaram a eficácia do algodão Bollgard® no controle de lagartas, ao mesmo tempo em que a redução do uso de pesticidas químicos levou ao aumento das populações de predadores naturais como joaninhas (*Coccinella septempunctata*), tesourinhas (*Chrysopa sinica*), aranhas e outros organismos não-alvo. Além disso, o algodão Bollgard® não levou a ressurgência de pulgões do algodão. Outro estudo realizado nos Estados Unidos avaliou os efeitos do algodão Bollgard® sobre inimigos naturais não-alvo durante seis anos (Naranjo, 2005; Naranjo, 2006). Foram avaliadas 22 taxas de insetos inimigos naturais que vivem em folhas e nenhum efeito crônico ou de longo-prazo foi detectado sobre essas espécies. Em 10 taxa, as aplicações de inseticidas tiveram efeitos maiores sobre os inimigos naturais que o algodão que expressa a proteína Cry1Ac. Esse estudo avaliou espécies de aranhas, coleópteros, heterópteros, neurópteros, dípteros, himenópteros e outras. As análises mostraram que, enquanto o algodão Bollgard® não mostrou efeitos negativos sobre inimigos naturais, as aplicações de inseticidas em algodão convencional mostrou efeitos adversos mais amplos e duradouros. O estudo concluiu que o algodão resistente a insetos pode ampliar as oportunidades para a conservação de inimigos naturais nessa cultura, pois esses organismos são muito afetados pelos inseticidas químicos utilizados nas práticas de controle habituais.

Recentemente, Marvier et al. (2007) utilizaram a abordagem de meta-análise para determinar se existe algum efeito sobre organismos não-alvo advindo do controle através de proteínas Cry expressas em algodão e milho geneticamente modificados resistentes a insetos. Essa abordagem permite que os pesquisadores combinem os resultados de muitos estudos independentes para testar uma hipótese de pesquisa. Os autores analisaram mais de 40 experimentos de campo envolvendo algodão e milho resistentes a insetos, expressando proteínas Cry, dentre elas a Cry1Ac. Os resultados mostraram que invertebrados não-alvo são geralmente mais abundantes em campos de algodão e milho resistentes a insetos do que em campos com culturas convencionais tratadas com inseticidas. Estudos conduzidos como parte dos processos de registro desses produtos têm consistentemente mostrado efeitos mínimos ou ausência de efeitos sobre organismos não-

alvo devido às proteínas Cry (Mendelsohn et al., 2003). De maneira geral, os testes de efeito em laboratório combinados com a meta-análise dos dados de campo mostram que, exceto pelos efeitos mínimos esperados no campo, a proteína Cry1Ac não causa efeitos nas espécies não-alvo que ocorrem nos agroecossistemas cultivados.

5.2. Transferência gênica

Outro fator avaliado para determinar a segurança ambiental do algodão MON 15985 é a possibilidade de transferência gênica (ou fluxo gênico), que pode ser definida como a incorporação de genes 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 ocorrer por transferência 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 hereditariedade (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 *cry2Ab2*, *cry1Ac*, *nptII*, *uidA* e *aad* do algodão MON 15985 para o algodão convencional e orgânico, o potencial de ocorrência da transferência de genes (exposição) e o efeito que essa transferência poderia acarretar (risco) 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 híbridos das plantações adjacentes no período de polinização (Mackenzie e Henry, 1990). Caso essa dispersão venha a ocorrer, é considerado 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) e que são sexualmente compatíveis. A importância desse tipo de transferência é minimizada quando se considera a proximidade 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 resistência a insetos presente no algodão MON 15985 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 únicas espécies silvestres ou asselvajadas com as quais o algodão MON 15985 poderia cruzar no Brasil. Portanto, sua presença no país representa a existência de recipientes sexualmente compatíveis com o algodão MON 15985 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 o potencial de transferência é baixo devido à distribuição relativamente 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 15985 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 15985 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 populações bacterianas 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 às 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 15985, estão presentes os genes exógenos *cry1Ac*, *cry2Ab2*, *nptII*, *uidA* e *aad*. Os genes *cry1Ac* e *cry2Ab2*, que conferem tolerância a algumas espécies de insetos lepidópteros, foram isolados da bactéria *B. thuringiensis*, que é encontrada em praticamente todos os tipos de solo (Kaji et al., 1994; Glare e O'Callaghan, 2000; Nester et al., 2002). Os genes marcadores de seleção *nptII*, *aad* e *uidA* 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-Berézin, 1997; Jefferson et al., 1986), sendo que apenas 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 actinomicetes. Tais organismos constituem 10% a 50% de todos os microrganismos de solo (Bergogne-Berézin, 1997). A resistência a estreptomicina em organismos é muito comum: 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 15985, se uma bactéria do trato digestivo adquirisse 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 15985) 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.

A freqüência desprezível de transferência gênica horizontal do gene *aad* do algodão Bollgard® (variedade que originou o algodão MON 15985 através da transformação genética) 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 freqüência 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 15985 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 *cry1Ac*, *cry2Ab2*, *nptII*, *uidA* e *aad* presentes no genoma do algodão MON 15985 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 *cry1Ac*, *cry2Ab2*, *nptII*, *uidA* e *aad* do algodão MON 15985 para outros organismos é desprezível.

5.3. Potencial como planta daninha

O algodão é uma planta com potencial mínimo de transformação em uma espécie daninha, e isso se aplica também ao algodão MON 15985. 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 15985 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 15985 e seus descendentes mantiveram as mesmas características reprodutivas da contraparte convencional.

Não se espera que as características conferidas pela introdução dos genes *cry2Ab2*, *cry1Ac*, *nptII*, *uidA* e *aad* proporcionem qualquer vantagem competitiva ou uma maior agressividade ao algodão MON 15985, que resultaria em uma espécie invasiva. As características de tolerância a certas espécies de lepidópteros 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. A única vantagem do algodão MON 15985 é a tolerância aos danos causados por algumas espécies de insetos lepidópteros. A dispersão de espécies de algodão no meio ambiente é tipicamente limitada por clima e fertilidade do solo, não pela pressão de insetos (Reed, 2000). A característica de tolerância aos insetos poderia até conceder uma vantagem adaptativa no meio ambiente. Entretanto, isso somente poderia ocorrer em sistemas nos quais os insetos servem de agentes limitantes para a propagação da planta. Não é esse o caso das plantas do algodão

MON 15985, no qual os genes *cry2Ab2* e *cry1Ac* conferem proteção somente contra algumas espécies de lepidópteros. Muitas outras espécies de insetos podem causar impacto na sobrevivência da planta em ambientes naturais e os genes *cry* no algodão MON 15985 não conferem à planta nenhuma vantagem sobre outras pragas (Glover, 2002). A característica de resistência a antibióticos conferida pelos genes *nptII* e *aad* também não faz com que o algodão MON 15985 possua alguma vantagem competitiva sobre outras espécies de planta. Uma vantagem competitiva existiria somente na presença dos agentes seletivos (antibióticos), mas esses produtos precisariam ser aplicados no ambiente de plantio do algodão MON 15985 para que a pressão seletiva existisse, o que não faz parte das práticas agrícolas utilizadas. O gene *uidA*, por sua vez, tem apenas a função de gene repórter e não é seletivo.

Em resumo, o algodão MON 15985 não possui características para o desenvolvimento de uma nova planta daninha, como qualquer outra variedade de algodão. A inserção dos genes *cry2Ab2*, *cry1Ac*, *nptII*, *uidA* e *aad* no genoma da planta não confere ao algodão nenhuma vantagem seletiva no ambiente natural. O algodão MON 15985 não adquiriu, pela inserção desses genes exógenos, nenhuma das características encontradas em 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).

5.4. Persistência das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 no solo

Vários fatores influenciam a persistência de proteínas Cry sob condições de campo, incluindo conteúdo de ácidos úmicos e argila no solo, tipo de argila, pH, umidade, conteúdo e tipo de íon solúvel, temperatura e atividade microbiana. Estudos com formulações microbianas de *B. thuringiensis* mostraram que as proteínas Cry são rapidamente degradadas (West, 1984; Pruett et al., 1980). Outros estudos sobre persistência e acumulação ambiental das proteínas Cry no solo foram conduzidos com a utilização de proteínas purificadas, demonstrando que tais proteínas podem ligar-se à argila e a ácidos úmicos em misturas artificiais de solo (Tapp e Stotzky, 1995; Koskella e Stotzky, 1997; Crechio e Stotzky, 1998; Tapp e Stotzky, 1998). Estudos em laboratório e em campo realizados com a proteína Cry1Ac purificada e com plantas de algodão Bollgard® (parental do algodão MON 15985) demonstraram uma rápida degradação no solo (Ream, 1994b). A degradação ambiental da proteína Cry1Ac foi avaliada pela medição da taxa em que sua bioatividade é dissipada quando adicionada ao solo como proteína purificada ou como um componente do tecido do algodão resistente a insetos (amostras liofilizadas de tecidos obtidos de experimentos de campo). A bioatividade foi determinada após o período de incubação das substâncias-teste no solo por meio de bioensaios com lagartas-das-maçãs (*Heliothis virescens*) em dieta artificial. O experimento com a proteína Cry1Ac purificada demonstrou uma meia-vida no solo estimada entre 9,3 e 20,2 dias. O experimento com tecido liofilizado do algodão Bollgard®, adicionado à dieta na concentração de 0,01 g/g de peso seco de solo, demonstrou que a bioatividade da proteína Cry1Ac foi dissipada com uma meia-vida estimada de 41 dias. Os resultados desse estudo estabeleceram que a proteína Cry1Ac se degrada rapidamente quando adicionada ao solo como componente pós-colheita do algodão Bollgard® e em taxas comparáveis àquelas relatadas para formulações microbianas de *B. thuringiensis*. Os valores estimados de meia-vida nesse estudo foram similares às taxas de degradação observadas por Palm et al. (1996, 1994 e 1993) para plantas geneticamente transformadas que expressam proteínas Cry.

Baseado em uma densidade de plantio de 150 mil plantas/ha e no nível mais alto de expressão da proteína Cry1Ac na planta total, um total de 3,6 g/ha da proteína Cry1Ac pode ser incorporado ao solo. Simulando essas práticas agrícolas em condições de campo no Brasil, um estudo foi realizado sobre a degradação da proteína Cry1Ac em restos culturais de algodão que permanecem na superfície do solo após a colheita (Lambais, 2001). Esse estudo estimou a presença da proteína Cry1Ac em restos culturais do algodão Bollgard® amostrados em três locais utilizando anticorpos policlonais em análises *Western blot*. Os dados demonstraram que a proteína Cry1Ac extraída dos restos culturais do algodão Bollgard®, secos na superfície do solo, sofreu a ação de proteases e foi degradada. Esse resultado sugere que, na prática, a proteína Cry1Ac é degradada antes da incorporação dos restos culturais no solo. Uma avaliação de campo realizada após seis anos de cultivo contínuo do algodão Bollgard® estimou o nível da proteína Cry1Ac acumulada no solo no período (Head et al., 2002; Head, 2007). A avaliação foi realizada por meio de bioensaios com a lagarta-da-maçã (*H. virescens*) e ELISA, revelando que a proteína Cry1Ac não foi encontrada em nenhuma das amostras de solo coletadas dentro e fora dos campos com algodão Bollgard®. A quantidade de proteína Cry1Ac acumulada no solo pelo uso contínuo do algodão Bollgard® foi menor do que o nível de detecção dos ensaios, indicando a perda de bioatividade e ocorrência de degradação da proteína.

O destino ambiental da proteína Cry2Aa de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressa em tecido de algodão foi avaliado pela determinação da redução da atividade biológica da proteína incubada em solo por 120 dias (Sims e Ream, 1997; Head, 2007). Os estudos foram conduzidos em condições de microcosmo em laboratório e de campo nos Estados Unidos. Um biosensaio de insetos, baseado na inibição de crescimento da lagarta *Heliothis virescens*, foi usado para estimar os valores DT₅₀ (tempo para 50% de dissipação = "meia-vida" da bioatividade) da proteína Cry2A. Os valores DT₅₀ foram 15,5 e 31,7 dias para o laboratório e o campo, respectivamente. As porcentagens iniciais da bioatividade da proteína Cry2A que restaram após 40 dias de incubação foram similares para as amostras de laboratório e campo. Nos dois ambientes, menos que 25% da bioatividade inicial permaneceram após 120 dias. Esses resultados indicaram que a atividade biológica da proteína Cry2A como componente de restos culturais do algodão geneticamente modificado resistente a insetos se dissipa prontamente quando as plantas são cultivadas em solo, e sugere que o microcosmo de solo em laboratório pode ser útil para estimar a taxa de dissipação que ocorre no campo.

Os resultados do estudo de degradação da proteína Cry2Ab2 no solo mostraram que essa proteína se dissipa rapidamente no meio ambiente de solo. Análises de solos do Mississippi, Arizona e Alabama tratados com a proteína Cry2Ab2 purificada por bioensaio com insetos estabeleceram que o intervalo DT₅₀ foi de 1,1-3,5 dias, enquanto o intervalo da DT₉₀ (tempo para degradação de 90% da proteína) foi de 1,9-5,3 dias (Dubelman et al., 2001; Monsanto, 2004; Head, 2007). Esses resultados permitem a conclusão de que a proteína Cry2Ab2 derivada do algodão MON 15985 se degrada rapidamente no solo. Adicionalmente aos períodos curtos de DT₅₀ e DT₉₀ obtidos, os resultados em solos dosados com uma solução de proteína Cry2Ab2 pura sugerem que qualquer quantidade de proteína Cry2Ab2 que alcance o solo como proteína pura (por exudação de raízes ou outra maneira não combinada com os tecidos da planta) será degradada em menos de 6 dias. A rápida degradação da proteína Cry2Ab2 em solo assegura que o risco de exposição de organismos de solo a essa proteína seja mínimo.

A constatação da rápida degradação das proteínas Cry no meio ambiente mostrada acima é um dos componentes importantes abordados na avaliação da segurança ambiental dessas proteínas e do algodão MON 15985.

6. MANEJO DE RESISTÊNCIA DE INSETOS

A resistência de insetos a táticas de controle é um fenômeno natural e pré-adaptativo, podendo ocorrer em qualquer espécie praga submetida a uma pressão de seleção. Conforme relata Georghiou e Lagunes-Tejeda (1991) há vários casos de resistência de artrópodos pragas a defensivos agrícolas. Existe o relato de aproximadamente 504 espécies resistentes a defensivos agrícolas de diferentes grupos químicos, tais como piretróides, carbamatos e fosforados. A constatação da ocorrência de pragas resistentes a grupos químicos inseticidas mostra que há também a necessidade de adoção de medidas visando evitar ou retardar a evolução de insetos resistentes ao controle exercido pelas proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 expressas no algodão MON 15985, preservando suas características técnicas e os benefícios aos agricultores e ao meio ambiente.

A presença simultânea de duas proteínas inseticidas no algodão MON 15985 é um importante fator para evitar a evolução de resistência, uma vez que reduz drasticamente a sobrevivência das pragas alvo e conseqüentemente a probabilidade de seleção de indivíduos com pares de alelos recessivos para resistência simultânea às duas proteínas. Com base na literatura científica disponível, uma estratégia para o Manejo de Resistência de Insetos (MRI) para plantas resistentes a insetos como o algodão MON 15985 deve contemplar componentes como instalação de áreas de refúgio, ações educacionais e constante monitoramento da suscetibilidade das populações de lepidópteros pragas submetidas ao fator de seleção, no caso as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 (Roush, 1997; Gould, 1998).

O algodão MON 15985 deverá estar inserido no contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP) e conservado por ações do plano de MRI aqui descrito. No futuro, à medida que se acumule conhecimento sobre o algodão MON 15985, as ações do MRI poderão ser aprimoradas. Para tanto, são indispensáveis o treinamento técnico, a boa comunicação e o trabalho conjunto entre a comunidade científica, a indústria, os assistentes técnicos e os cotonicultores, garantindo os benefícios do algodão MON 15985. A seguir os componentes do MRI são apresentados.

6.1. Área de refúgio

A área de refúgio é uma importante fonte de indivíduos suscetíveis SS, os quais são úteis para evitar ou retardar a evolução da resistência, uma vez que a estratégia é que esses indivíduos ocorram de modo a proporcionar seu acasalamento com os possíveis indivíduos RR e SR selecionados, advindos da área cultivada com o algodão Bollgard[®], diluindo desta forma a frequência de resistência na população (Gould, 1998). A configuração da área de refúgio deverá possibilitar o encontro entre indivíduos RR e SR sobreviventes das áreas de algodão MON 15985 e mariposas SS originadas na área de refúgio ou em áreas adjacentes com outras culturas.

O sucesso da implementação das áreas de refúgio como uma das ações previstas na estratégia do MRI depende da precisão dos critérios científicos utilizados em sua composição e de aspectos práticos para sua implementação pelos agricultores. Dessa forma, as áreas de refúgio deverão estar inseridas nas práticas agrícolas recomendadas para a cultura, considerando aspectos operacionais e de viabilidade econômica da cultura. Vários fatores estão envolvidos na definição da melhor configuração da área de refúgio: 1) a capacidade de dispersão das pragas alvo que se deseja evitar o aparecimento de indivíduos resistentes; 2) a disponibilidade de hospedeiros alternativos para a alimentação e reprodução das pragas alvo influencia a disponibilidade de indivíduos SS para cruzamentos

com indivíduos RR e SR; 3) a escolha da espécie a ser plantada nas áreas de refúgio como fonte de indivíduos suscetíveis às proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 do algodão MON 15985 é outra decisão importante; 4) a proporção adequada entre o algodão MON 15985 e o algodão sem a tecnologia.

Espécie a compor a área de refúgio

A espécie a ser plantada como área de refúgio deverá ser o algodoeiro, uma vez que esta cultura é fonte preferencial de alimentação das pragas em questão, com exceção da *Spodoptera frugiperda*. A cultivar a ser plantada não poderá ser o algodão Bollgard® e nem o algodão MON 15985.

Distância entre o refúgio e a área de algodão MON 15985

A distância entre a área de refúgio e o plantio do algodão MON 15985 deverá ser de no máximo 800 m na ocorrência de *Pectinophora gossypiella* (lagarta-rosada) ou de no máximo 1.500 m na ausência de infestação desta espécie.

Proporção entre as áreas de refúgio e de algodão MON 15985

A proporção entre a área de plantio do algodão MON 15985 e a área de refúgio deverá ser de 5%, ou seja, a área de refúgio será composta de cultivares de algodão que não expressem as proteínas Cry1Ac e/ou Cry2Ab2 na proporção de área equivalente a 5% da área total plantada com o algodão MON 15985. Para a determinação desta proporção, os seguintes fatores foram considerados: 1) presença de duas proteínas inseticidas (Cry1Ac e Cry2Ab2) na mesma planta com distintos modos-de-ação, interação aditiva e alta expressão (dose) nos tecidos da planta (Head 2001); 2) alta eficiência de controle de *Spodoptera frugiperda*, *Alabama argillacea*, *Heliothis virescens* e *Pectinophora gossypiella*; 3) alta suscetibilidade das pragas alvo às proteínas do algodão MON 15985 e baixa frequência do alelo de resistência no ambiente; 4) baixa frequência de alelos para resistência às proteínas inseticidas do algodão MON 15985; 5) presença de uma grande quantidade de hospedeiros alternativos para a *Spodoptera frugiperda* no Brasil, incluindo culturas comerciais e plantas daninhas; 6) efeito dos inseticidas usados para o controle de outras pragas como o bicudo em lepidópteros; 7) favorecimento do controle de pragas por inimigos naturais pela redução da quantidade de inseticidas usados no algodão MON 15985; 8) invernos relativamente quentes nas regiões produtoras possibilitando maior período de cruzamentos de insetos resistentes com indivíduos suscetíveis, entre outros.

Manejo e condução da área de refúgio

Nas áreas de refúgio deverão ser adotadas as práticas agrícolas recomendadas para a cultura do algodoeiro nas regiões produtoras (fertilização, controle de plantas daninhas, controle de doenças, reguladores de crescimento, maturadores, desfolhantes, etc). As espécies pragas que infestarem as áreas de refúgio deverão ser controladas pelo método mais adequado para a situação, sempre que sua população atingir o nível de controle, conforme recomendações do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Para o controle dos lepidópteros alvos de algodão MON 15985 (*Alabama argillacea*, *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella* e *Spodoptera frugiperda*) não poderão utilizados produtos formulados à base de *Bacillus thuringiensis*.

6.2. Monitoramento da suscetibilidade das pragas

O monitoramento é uma importante estratégia na avaliação da efetividade do programa de MRI na manutenção da frequência gênica de resistência de insetos pragas alvo (Sims et al., 1996). O monitoramento do aparecimento de insetos resistentes às proteínas do algodão MON 15985 em populações de insetos das regiões produtoras deverá ser feito na frequência necessária, a ser determinada na medida da evolução dos plantios e no aprofundamento dos conhecimentos do comportamento desta cultura no Brasil. A Monsanto do Brasil Ltda. desenvolverá juntamente com outras Instituições um programa para acompanhar o nível de suscetibilidade e dose diagnóstica das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 para os lepidópteros pragas que são alvo do algodão MON 15985. Populações de insetos serão coletadas nas principais regiões produtoras e encaminhadas para o(s) laboratório(s) com capacidade técnica para a condução deste trabalho. As populações serão expostas às proteínas do algodão MON 15985 e sua resposta será avaliada de modo a estabelecer o histórico de suscetibilidade destas pragas às proteínas em questão, assim como permitirá identificar genes de resistência nas populações das diferentes regiões.

6.3. Ações educacionais

Através das ações educacionais, os cotonicultores, consultores e assistentes técnicos estarão cientes da importância do MRI, da facilidade de implementação das áreas de refúgio e da viabilidade econômica das plantas cultivadas nestas áreas. As palestras técnicas serão o principal veículo para a divulgação das práticas do MRI e deverão ser proferidas para agricultores, consultores e assistentes técnicos das principais regiões produtoras. Nestas oportunidades serão apresentadas também informações sobre o correto uso do algodão MON 15985 e sobre outras ações que compõem o MRI. No momento da compra da semente certificada de algodão MON 15985, um impresso com as instruções e as recomendações básicas sobre os procedimentos de instalação das áreas de refúgio será entregue aos agricultores, de forma a serem conhecidas e disponíveis no momento do plantio. Para o mesmo objetivo, a etiqueta da sacaria das sementes do algodão MON 15985 terá instruções e recomendações sobre a correta instalação das áreas de refúgio. Nas ações do MRI, principalmente na instalação das áreas de refúgio, o agricultor é fator decisivo no sucesso do programa e para a manutenção desta tecnologia no Brasil. Portanto, existe essa necessidade de orientá-los sobre os procedimentos corretos e na efetiva implantação das áreas de refúgio em suas propriedades agrícolas.

6.4. Plano de mitigação

Aos agricultores usuários do algodão MON 15985 e aos técnicos envolvidos na sua recomendação e assistência técnica caberá a responsabilidade de monitorar os níveis populacionais das pragas nas lavouras de algodão MON 15985, bem como relatar casos de escapes e a necessidade de pulverizações inseticidas para as pragas alvo da tecnologia. Na eventualidade do aparecimento de populações resistentes de *Spodoptera frugiperda*, *Alabama argillacea*, *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella*, a Monsanto do Brasil Ltda. deverá investigar as causas determinantes à deficiência do controle, através do seguinte procedimento: 1) amostragem de tecido da planta de algodão MON 15985 para identificação da presença dos genes responsáveis pela expressão das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2; 2) quantificação da expressão da proteína Cry1Ac em tecidos de algodão MON 15985; 3) coleta de populações de insetos na área de cultivo onde ocorreram os escapes,

para a realização de bioensaios para avaliação de fenótipos resistentes; 4) uma vez detectada alta infestação de alguma das pragas alvo do algodão MON 15985, recomendar-se-á a pulverização de inseticida registrado para a espécie em questão, capaz de reduzir eficientemente a sua população. Em caso de confirmação de resistência, as seguintes medidas serão tomadas pela Monsanto do Brasil Ltda.: 1) notificação dos clientes e técnicos da área afetada; 2) recomendação de medidas de controle da praga alvo (a ser considerado caso a caso); 3) recomendação de destruição de restos culturais, após colheita, de modo a minimizar a sobrevivência da praga alvo para a próxima safra; 4) monitoramento da praga alvo de maneira contínua. Se pertinente, haverá a suspensão da comercialização da tecnologia em áreas onde forem identificados casos de resistência, em alta frequência gênica; 5) o algodão MON 15985 poderá ser novamente ser cultivado nestas áreas tão logo a frequência de indivíduos resistentes retorne aos níveis aceitáveis, com o restabelecimento da suscetibilidade da praga alvo às proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 expressas na planta.

6.5. Refúgio natural para o algodão MON 15985 nos Estados Unidos

A US EPA aprovou em junho/2007 o uso de refúgio natural (outra cultura, diferente do algodão) para o algodão MON 15985 plantado na maior parte do cinturão do algodão nos estados do Alabama, Arkansas, Flórida, Geórgia, Kansas, Kentucky, Louisiana, Maryland, Missouri, Mississippi, Carolina do Norte, Oklahoma, Carolina do Sul, Tennessee, Texas (excluindo algumas áreas) e Virgínia. Essa aprovação da US EPA se aplica somente ao algodão MON 15985 nas áreas onde há o registro para uso. Além disso, o refúgio é requerido para o algodão Bollgard[®]. Essa decisão é importante, pois permite que os agricultores que querem plantar o algodão MON 15985 simplifiquem seu programa de controle de pragas, utilizando uma tecnologia com duas proteínas Cry (Cry1Ac e Cry2Ab2). A expressão das duas proteínas no algodão MON 15985 reduz a possibilidade de evolução de resistência de pragas a essas proteínas. Além disso, a decisão permite o aumento do rendimento de fibras de algodão por eliminar as perdas associadas com o plantio de áreas de refúgio com algodão convencional. Os agricultores que plantam algodão Bollgard[®] em qualquer area ou algodão MON 15985 for a das areas que foram aprovadas para refúgio natural devem instalar as áreas de refúgio estruturado de 5% para áreas sem aplicação de inseticidas e 20% para áreas com aplicação de inseticidas, utilizando algodão convencional.

7. BENEFÍCIOS

A tecnologia de resistência a insetos promove benefícios como o controle de pragas e o aumento da produtividade, sem afetar as espécies não-alvo, especialmente os inimigos naturais. O algodão MON 15985 contém os genes *cry1Ac* e *cry2Ab2* que conferem a característica de resistência a insetos, sendo utilizado em países onde foi aprovado comercialmente para os mesmos fins que o algodão convencional, ou seja, como alimento e ração animal, e produção de fibras. O cultivo do algodão MON 15985 representa não apenas uma melhor alternativa para o melhor controle de pragas importantes do algodão, mas também uma estratégia eficiente e ecologicamente compatível com o manejo integrado de pragas. Essa tecnologia tem proporcionado benefícios significativos, dentre os quais destacam-se:

- A proteção contra pragas alvo ocorre durante todo o ciclo da cultura;
- O controle de pragas não causa efeitos negativos sobre organismos não-alvo, muitos deles espécies benéficas do agroecossistema;

- A segurança para o homem, peixes, répteis, aves e outros mamíferos é um benefício em relação ao uso de inseticidas químicos convencionais. A redução da exposição de trabalhadores rurais e agricultores aos produtos químicos utilizados na cultura do algodão tem sido verificada em diversos países;
- A estratégia para o controle de pragas no algodão é confiável e econômica, beneficiando agricultores com grandes, médias e pequenas áreas de plantio;
- O controle de lagartas é efetuado de maneira ecologicamente compatível para minimizar os impactos negativos ao meio ambiente;
- A redução significativa na quantidade de inseticidas químicos aplicada na cultura do algodão tem sido verificada, com rendimento no mínimo semelhante ao algodão convencional;
- A redução na fabricação, transporte e armazenamento de inseticidas químicos utilizados na cultura do algodão tem sido observada e é considerada um benefício indireto da tecnologia;
- A redução no número de embalagens vazias e produtos químicos que devem ser descartados de acordo com as regulamentações aplicáveis a esses casos é um benefício ambiental importante;
- A excelente adequação a programas de manejo integrado de pragas e sistemas sustentáveis de produção agrícola.

Quando se fala de benefícios das culturas geneticamente modificadas, é importante mencionar que a área cultivada acumulada entre 1996 e 2006 excedeu meio bilhão de hectares, mais precisamente, chegou a 577 milhões ha, com um aumento sem no uso da tecnologia de 60 vezes em 10 anos (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. Em 2006, culturas geneticamente modificadas resistentes a insetos ocuparam 19 milhões ha (19%) enquanto culturas tolerantes a herbicidas ocuparam 70 milhões ha (68%) 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 resistentes a insetos é a redução do uso de pesticidas. Tomando o algodão geneticamente modificado resistente a insetos como exemplo, entre 1996 e 2005, a redução do uso de ingredientes ativos foi da ordem de 19,4%, o que equivale a uma redução de aproximadamente 94,5 milhões Kg de inseticidas nessa cultura geneticamente modificada resistente a insetos e de 24,3% no impacto ambiental causado por ela em relação ao algodão convencional (Brookes e Barfoot, 2006; Brookes e Barfoot, 2007).

Os benefícios gerados pelas culturas geneticamente modificadas resistentes a insetos têm revolucionado a agricultura (Shelton et al., 2002). Os genes *cry* oriundos de *B. thuringiensis* têm sido introduzidos com sucesso nas principais culturas utilizadas na alimentação humana e animal. Essas culturas têm resultados em benefícios econômicos significativos para os agricultores e também têm levado à redução do uso de inseticidas químicos, como mostrado acima. A expectativa de que culturas Bt trariam menores consequências ecológicas e menor risco à saúde humana e animal, gerando benefícios maiores que as tecnologias alternativas de controle de pragas, tem se confirmado. Uma revisão sobre as consequências econômicas, ambientais, de segurança alimentar para humanos e animais, e sociais das plantas que expressam proteínas Cry como forma de controle de pragas foi publicada por Shelton et al. (2002).

8. CONCLUSÕES

A eficácia do algodão MON 15985 no controle de pragas lepidópteras importantes da cultura do algodão ficou demonstrada desde os primeiros experimentos de campo nos Estados Unidos e foi confirmada posteriormente em outros países. A caracterização molecular do algodão MON 15985 foi realizada e o desempenho agrônômico das variedades geradas por melhoramento convencional foi avaliado, demonstrando excelentes resultados. Estudos detalhados sobre a segurança alimentar e ambiental do algodão MON 15985 e das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 foram realizados e continuam sendo gerados, todos eles comprovando a segurança para o meio ambiente e o consumo animal e humano. As análises incluíram a caracterização molecular do DNA introduzido no genoma do algodão, a análise de expressão das proteínas (Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII e GUS) no algodão MON 15985, a análise das características fenotípicas e de rendimento, além da avaliação de eficácia para o controle de pragas alvo. A avaliação de segurança ambiental levou em consideração os efeitos em organismos não-alvo, o fluxo gênico para espécies silvestres e convencionais, a transferência de genes para bactérias, a persistência das proteínas Cry no solo e o potencial do algodão MON 15985 como planta daninha. Para confirmar a segurança alimentar, foram realizadas avaliações da qualidade nutricional do algodão MON 15985 para animais como peixes, aves e mamíferos, estudos de toxicidade oral aguda das proteínas Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII e GUS para camundongos, análises da segurança das proteínas expressas. Adicionalmente, as análises da composição do algodão MON 15985 foram realizadas e ficou estabelecida a sua equivalência substancial com as variedades convencionais de algodão. Assim, o algodão MON 15985 foi considerado tão seguro quanto o algodão convencional para o meio ambiente e o uso na alimentação humana e animal.

O algodão MON 15985 foi lançado comercialmente em 2002 nos Estados Unidos, e posteriormente em vários países. Um grande número de estudos foi realizado para confirmar os resultados de segurança ambiental e alimentar apresentados para o algodão MON 15985. Alia-se aos resultados de campo e laboratório obtidos com o algodão MON 15985 e as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2, o histórico de mais de cinco anos de uso desse produto, de mais de 10 anos do uso do algodão Bollgard® (parental do algodão MON 15985), assim como o histórico de uso seguro de formulações de esporos de *B. thuringiensis* por mais de 40 anos. As proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 são, portanto, ferramentas eficazes e seguras no controle de pragas importantes da cultura do algodão e devem ser usadas como ferramentas no controle integrado de pragas, considerando as práticas para o manejo da resistência de insetos.

9. REFERÊNCIAS

- 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>)
- AOAC. 1998. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 5th Ed., Methods Ba 7-58 and Ba 8-78, American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois.
- AOAC. 2005a. Official Methods of Analysis, 18th Ed., Method 923.03, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland.
- AOAC. 2005b. Official Methods of Analysis, 18th Ed., Method 960.39, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland.
- AOAC. 2005c. Official Methods of Analysis, 18th Ed., Methods 926.08 and 925.09, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland.
- AOAC. 2005d. Official Methods of Analysis, 18th Ed., Methods 955.04 and 979.09, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland.

- Araújo, A.S.F.; Monteiro, R.T.R. e Abarkeli, R.B. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*. 52:799-804.
- Aronson, A.I.; Backman, W.; Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
- Astwood, J.D. 1995a. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 insecticide protein (B.t.k. HD-73 protein) shares no significant sequence similarity with proteins associated with allergy or coeliac disease. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-14173.
- Astwood, J.D. 1995b. Neomycin phosphotransferase II (NPTII) shares no significant sequence similarity with proteins associated with allergy or coeliac disease. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-14177.
- 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.
- 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.
- Berberich, S.A.; Jackson, T.L.; Ream, J.E.; Halsey, M.E.; Augustin, J.G.; Dodson, H.C.; Leach, J.N.; Ledesma, B.E.; Weston, P.T. 1994. Avaliação das linhagens de algodão resistentes a insetos em locais de teste no campo em 1993 nos EUA. Um estudo não publicado conduzido pela Monsanto. Relatório Técnico Monsanto St. Louis.
- Berberich, S.A.; Ledesma, B.E.; Augustin, J.G.; Leach, J.N.; Holden, L.R.; Ream, J.E. 1993. Assessment of specific protein expression levels in young leaf and seed tissues collected from the 1992 insect resistant cotton field trials. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-13275.
- Bergogne-Berézin, 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.
- Betz, F.S.; Hammond, B.G.; Fuchs, R.L. 2000. Safety of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Reg. Toxicol. Pharm.* 32: 156-173.
- 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.
- Bradstreet, R.B. 1965. The Kjeldahl method for organic nitrogen. Academic Press, New York, New York.
- 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).
- Cantwell, G.E.; Lehnert, T.; Fowler, J. 1972. Are biological insecticides harmful to the honey bee. *Am. Bee J.* 112: 294-296.
- Carter, J.N.; Liggett, M.P. 1994. Acute oral toxicity and infectivity/pathogenicity to rats of EG 7841, HRC Study Report No. ECO 6/942538. Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, England.
- Castillo A.R.; Gallardo, M.R.; Maciel, M.; Giordano, J.M.; Conti, G.A.; Gaggiotti, M.C.; Quaino, O.; Gianni, C.; Hartnell, G.F. 2004. Effects of feeding rations with genetically modified whole cottonseed to lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 87: 1778-1785
- 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.
- Clayton, R.A. 1992. Production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 *cry1Ac* insecticidal protein in 1000 liter recombinant *Escherichia coli* fermentation. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-12442.

- 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.
- Crechio, C.; Stotzky, G. 1998. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Bio. Biochem.* 30: 463-470.
- Crickmore, N.; Zeigler, D.R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
- David, R.M. 1989. Acute oral toxicity/pathogenicity study of “Cutlass OF” insecticide in rats. Report No. MBA study No. G-7155.222, Unpublished report for Ecogen Inc.,
- Davis, M.K.; Layton, M.B.; Varner, J.D.; Little, G. 1995a. Field evaluation of Bt-transgenic cotton in the Mississippi Delta. *In: Proceedings of the Beltwide Cotton Conference.* p. 771-775. National Cotton Council, Memphis, TN.
- Davis, M.K.; Layton, M.B.; Varner, J.D.; Little, G. 1995b. Field Evaluation of Bt-transgenic Cotton in the Mississippi Delta. *In: 1995 Proceedings Beltwide Cotton Conferences.* p. 641-645. National Cotton Council, Memphis, TN.
- Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid.* 42: 73-91.
- De Barjac, H.; Larget, I.; Bénichou, L.; Cosmao, V.; Viviani, G.; Ripouteau, H. e Papion, S. 1980. Innocuity test on mammals with serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. WHO (WHO/VBC/80.761).
- De la Cruz, F.; Davies, J. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 8: 128-133.
- Doherty, S.C.; Hamilton, K.A.; Lirette, R.P.; Borovkova, I. 2000a. Amended report for molecular characterisation of cotton event 15985. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-16620.
- Doherty, S.C.; Lirette, R.P.; Hamillton, K.A. 2000b. Molecular analysis of the stability of cotton event 15985. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-16749.
- Doolittle, R.F. 1990. Searching through sequence databases. *In: Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences. Methods in Enzymology.* 183:109.
- Dubelman, S.; J.W. Martin e M.K. Bhalgat. 2001. Aerobic Soil Degradation of the *Bacillus thuringiensis* Insect Protection Protein 2 in Cotton Leaf Tissue. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-16185.
- Dulmage, H. T. 1981. Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980. *In: Burges, H.D. (Ed). London: Academic Press,* p. 193-222.
- Dynamac. 1986. *Bacillus thuringiensis* Berliner. Task 2: Residue Chemistry Chapter. Contract No. 68-02-4266. Submitted to EPA.
- English, L.; Robbins, H.L.; von Tersch, M.A.; Kulesza, C.A.; Ave, D.; Coyle, D.; Jany, C.S.; Slatin, S.L. 1994. Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 24: 1025-1035.
- English, L.; Slatin, S.L. 1992. Mode of action of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22(1): 1-7.
- Fisher, R.; Rosner, L. 1959. Toxicology of the Microbial Insecticide, Thuricide. *J. Agric. Food. Chem.* 7: 686-688.
- Flachowsky, G.; Chesson, A.; Aulrich, K. 2005. Animal nutrition with feeds from genetically modified plants. *Archives of Animal Nutrition.* 59(1): 1-40.
- Flamm, E. 1993. Chymosin derived from *Escherichia coli* K12 and *Bacillus stearothermophilus* α -amylase derived from *Bacillus subtilis*. *In: OECD, Safety Evaluations of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concepts and Principles,* Paris, France, OECD. pp. 21-30.
- Flavell, R.B.; Dart, E.; Fuchs, R.L.; Fraley, R.T. 1992. Selectable marker genes: safe for plants? *Bio/Technology.* 10: 141-144.
- Flexner, J.L.; Lighthart, B.; Croft, B.A. 1986. The effects of microbial pesticides on non-target beneficial arthropods. *Agric. Ecosys. Environ.* 16: 203-254.
- Freire, E.C. 2000. Distribuição, Coleta, Uso e Preservação das Espécies Silvestres de Algodão no Brasil. Embrapa, Campina Grande. 22p.
- Fuchs, R.L. 1994. Gene expression and compositional analysis from field-grown insect resistant cotton lines expressing full length *B.t.k.* HD-73. Relatório Técnico Monsanto St. Louis.
- 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.
- Georghiou, G.P.; Lagunes-Tejeda, A. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. FAO, Rome. 318 p.
- 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.
- Gilissen, L.J.W.; Metz, P.L.J.; Stiekema, W.J.; Nap, J.-P. 1998. Biosafety of *E. coli* β -glucuronidase (GUS) in plants. *Trans. Res.* 7: 157-163.
- Glare, T.R.; O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. John Wiley & Sons, Ltd. UK. 350pp.
- 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.
- Gould, F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 701-726.
- Hadley, W.M.; Burchiel, S.W.; Mcdowell, T.D.; Thilsted, J.P.; Hibbs, C.M.; Whorton, J.A.; Day, P.W.; Friedman, M.B.; Stoll, R.E. 1987. Five-month oral (diet) toxicity/infectivity study of *Bacillus thuringiensis* insecticides in sheep. *Fundamental and Applied Toxicology*. 8: 236-242.
- Hamilton, K.A.; Pyla P.D.; Brezze M.; Olson, T.; Li, E.; Robinson, E.; Gallagher, S.P.; Sorbet, R.; Chen, Y. 2004. Bollgard II Cotton: Compositional analysis and feeding studies of cottonseed from insect-protected cotton (*Gossypium hirsutum* L.) producing the Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6969-6976
- 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.
- Head, G. 2007. Soil fate and non-target impact of Bt proteins in microbial sprays and transgenic Bt crops. In: *Crop Protection Products for Organic Agriculture. Environmental, Health and Efficacy Assessment*. A. Felsot, K. Racke, EDS. Chapter 15: 212-221.
- Head, G.; Moar, W.; Eubanks, M.; Freeman, B.; Ruberson, J.; Hagerty, A.; Turnipseed, S. 2005. A multiyear, large-scale comparison of arthropod populations on commercially managed Bt and non-Bt cotton fields. *Environmental Entomology*. 34 (5): 1257-1266.
- Head, G.; Surber, J.; Watson, J.; Martin, J.; Duan, J. 2002. No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (Bollgard) use. *Environmental Entomology*. 31(1): 30-36.
- Head, G.P. 2001. Insect Resistance Management Plan for Bollgard II Cotton. St Louis, Mo, USA.
- Hileman, R.E.; Astwood, J.D. 2000a. Bioinformatics analysis of NPTII protein sequence utilizing an allergen database. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-16801.
- Hileman, R.E.; Astwood, J.D. 2000b. Bioinformatics analysis of NPTII protein sequence utilizing toxin and public domain genetic databases. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-16800.
- 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.
- Hodal, L.A.; Bocharde, J.E.; Nielsen, O.; Mattsson, A.; Okk, F.T. 1992. Detection, expression and specific elimination of endogenous β -glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic plants. *Plant Sci.* 87: 115-122.
- Hofmann, C.; Lüthy, P.; Hutter R.; Pliska, V. 1988a. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* 173: 85-91.
- Hofmann, C.; Vanderbruggen, H.; Hofte, H.; Van Rie, J.; Jansens, S.; Van Mellaert, H. 1988b. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *PNAS USA*. 85: 7844-7848.
- Höfte, H.; Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Hu, C.Y.; Chee, P.P.; Chesney, R.H.; Zhou, J.H.; Miller, P.D.; O'Brien, W.T. 1990. Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep.* 9: 1-5.
- Ignoffo, C.M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 217: 141-172.
- IPCS. 2000. Environmental Health Criteria, 217: *Bacillus thuringiensis*. (http://www.who.int/pics/docs/ehc_217.html)
- 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.
- Joung, K.-B.; Cote, J.-C. 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Health Canada -Technical Bulletin*, n. 29.
- Kaji et al. 1994. *Sys. Appl. Microbiol.* 17 (1): 104-107.

- Kalthoff, I.M.; Sandell, E.B. 1948. Quantitative inorganic analysis. MacMillan, New York.
- Keck, P.J.; Mitsky, T.A. 1994. Comparative alignment of insecticidally-active *B.t.k.* HD-73 protein (*B.t.k.* protein) to known allergenic and toxic proteins using the FASTa algorithm. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-13643.
- Kimber, I.; Kerkvliet, N.I.; Taylor, S.L.; Astwood, J.D.; Sarlo, K.; Dearman, R.J. 1999. Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization. *Toxicol. Sci.* 48: 157-162.
- Klausner, A. 1984. Microbial insect control. *Bio/Technology.* 2: 408-419.
- Kolwyck, D.; Hamilton, K.; Lirette, R. 2000b. Protein levels in insect-protected cotton samples produced in the 1999 U.S. field trials. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-16724.
- Kolwyck, D.; Hamilton, K.; Reed, A.; Lirette, R. 2000a. Protein levels in insect protected cotton samples produced in the 1998 U.S. field trials. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-16612.
- Koskella, J.; Stotzky, G. 1997. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9): 3561-3568.
- Krieg, A.; Langenbruch, G. A. 1981. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. Burges, H. D. (Ed). London: Academic Press, p. 837-896.
- Lambais, M.R. 2001. Detecção da proteína Cry1Ac em restos culturais de algodão transgênico DP-90 Bollgard®. Relatório de Pesquisa. Departamento de Solos e Nutrição Animal/ESALQ/USP, Piracicaba, SP. 9p. Relatório de estudo apresentado a Monsanto, não publicado.
- 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.
- Leong, K.L.H.; Cano, R.J.; Kubinski, A.M. 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. *Environ. Entomol.* 9: 593-599.
- Li, M.H.; Robinson, E.H. 2000. Evaluation of processed cottonseed meal derived from insect protected cotton lines 15813 and 15985 as a feed ingredient for catfish. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-16179.
- Lundry, D.R.; Nemeth, M.A.; Riordan, S.G.; Miller, K.D. 2007. Composition analyses of cottonseed from MON 15985 produced in Brazil during the 2005/2006 field season. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-20636.
- MacIntosh, S.C.; Stone, T.B.; Sims, S.R.; Hunst, P.L.; Greenplate, J.T.; Marrone, P.G.; Perlak, F.J.; Fischhoff, D.A.; Fuchs, R.L. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* against agronomically important insects. *J. Environ. Entomol.* 56: 258-266.
- 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.
- Maggi, N.L. 1993a. Evaluation of dietary effects of purified B.t.k. endotoxin proteins on honey bee larvae. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-17765.
- Maggi, N.L. 1993b. Evaluation of dietary effects of purified B.t.k. endotoxin proteins on honey bee adults. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-17764.
- Maggi, V.L. 2000a. Evaluation of the dietary effects of insect protection protein 2 on adult honey bees (*Apis mellifera* L.). Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL 16176.
- Maggi, V.L. 2000b. Evaluation of dietary effects of purified *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab protein on honey bee larvae. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-16961.
- Mandal, A.B.; Elangovan, A.V.; Shrivastav, A.K.; Johri, A.K.; Kaur, S.; Johri, T.S. 2004. Comparison of broiler chicken performance when fed diets containing meals of Bollgard II hybrid cotton containing Cry-X gene (Cry1Ac and Cry2Ab gene), parental line or commercial cotton. *British Poultry Science* Volume 45, Number 5 (October 2004), pp. 657-663.
- Marvier, M.; McCreedy, C.; Regetz, J. e Kareiva, Peter. 2007. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. *Science.* 316 (5830): 1475-1477.
- McClintock, J.T.; Schaffer, C.R.; Sjoblad, R.D. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45: 95-105.
- Meeusen, R.L.; Atallah, Y. 1990. In: *Biotechnology and Food Safety*. (D.D. Bills and S.D. Kung, Eds.) Butterworth-Heineman. pp. 267-273.
- Mendelsohn, M.; Kough, J.; Vaituzis, Z.; Mattews, K. 2003. Are Bt crops safe? *Nature Biotechnology.* 21(9): 1003-1009.
- 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.* 36(S): S165-S186.
- Miki, B.; McHugh, S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants - Applications, Alternatives and Biosafety. *Journal of Biotechnology.* 107(3): 193-232.
- Monsanto. 2004. Product Safety Summaries; Monsanto Company: St. Louis, MO, June 22, 2004. (www.monsanto.com/monsanto/layout/our_pledge/transparency/prod_safety.asp).

- Morrison, M. 1996. Do ruminal bacteria exchange genetic material? J. Dairy Sci. 79: 1476-1486.
- Mozaffar, S.; Silvanovich, A. 2007. Assessment of the Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII, and protein GUS levels in cotton leaf and seed tissues from MON 15985 produced in 2006 Brazil field trials. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-20725.
- Nap, J.-P.; Bijvoet, J.; Stikema, W.J. 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants: an overview. Transgenic Research. 1: 239-249.
- Naranjo, 2005. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. Environ. Entomol. 34 (5): 1193-1210.
- Naranjo. 2006. Functional non-target differences between Bt and conventional cotton. Second International Symposium on Biological Control of Arthropods. 370-381. (http://www.biosicherheit.de/pdf/aktuell/davos_session7.pdf).
- Naylor, M.W. 1992. Acute oral toxicity study of beta-glucuronidase (GUS) protein in albino mice. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-12485.
- Naylor, M.W. 1993a. Acute oral toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* [Cry1Ac] HD-73 protein in albino mice. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-14418.
- Naylor, M.W. 1993b. One month feeding study with insect-resistant cottonseed meal in Sprague-Dawley rats. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-13208.
- Naylor, M.W. 1996. Acute oral toxicity study of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 CryIIA (btk P2) protein in albino mice. Relatório Técnico Monsanto St Louis.
- Nester, E.; Thomashow, L.; Metz, M.; Gordon, M. 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: a critical scientific assessment. American Academy of Microbiology: 1-22.
- 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.
- Palm, C.J.; Donegan, K.K.; Harris, D.; Seidler, R.J. 1994. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. Mol. Ecol. 3: 145-151.
- Palm, C.J.; Schaller, D.L.; Donegan, K.K.; Seidler, R.J. 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. Can. J. Microbiol. 42: 1258-1262.
- Palm, C.J.; Seidler, R.J.; Donegan, K.K.; Harris, D. 1993. Transgenic plant pesticides: Fate and Persistence in soil. Plant Physiol. Suppl. 102, 166.
- Palmer, S.J.; Beavers, J.B. 1993a. B.t.k. HD-73 protein: dietary toxicity study with ladybird beetles (*Hippodamia convergens*). Relatório Técnico Monsanto St Louis WL 93-232.
- Palmer, S.J.; Beavers, J.B. 1993b. B.t.k. HD-73 protein: dietary toxicity study with parasitic Hymenoptera (*Nasonia vitripennis*). Relatório Técnico Monsanto St Louis WL 93-234.
- Palmer, S.J.; Beavers, J.B. 1993c. B.t.k. HD-73 protein: Dietary toxicity study with green lacewing larvae (*Crysopa carnea*). Relatório Técnico Monsanto St Louis WL 93-233.
- Palmer, S.J.; Krueger, H.O. 2000a. Insect protection protein 2: a dietary toxicity study with green lacewing larvae (*Chrysomera carnea*). Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-16171.
- Palmer, S.J.; Krueger, H.O. 2000b. Insect protection protein 2: a dietary toxicity study with parasitic hymenoptera (*Nasonia vitripennis*). Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-16173.
- Palmer, S.J.; Krueger, H.O. 2000c. Insect protection protein 2: a dietary toxicity study with the ladybird beetle (*Hippodamia convergens*). Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-16172.
- Palmer, S.J.; Krueger, H.O. 2000d. Insect protection protein 2: an acute toxicity study with the earthworm in an artificial soil substrate. Relatório Técnico Monsanto St Louis MSL-16177.
- Prins, T.W.; Zadoks J.C. 1994. Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a Literature review. Euphytica. 76: 133-138.
- Pruett, C.J.; Burges, H.D.; Wyborn, C.H. 1980. Effect of exposure to soil on the potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 35: 166-174.
- Ream, J.E. 1994a. Avaliação in vitro da degradação digestiva da proteína HD-73 do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-14417.
- 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.
- Roush, R.T. 1997. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? Pest. Sci. 51: 328-334.

- Sacchi, V.F.P.; Parenti, G.M.; Hanozet, G.M.; Giordana, B.; Luthy, P.; Wolfersberger, M.G. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. FEBS Letters. 204: 213-218.
- Sammons, R.D. 1993. Characterization of purified *B.t.k.* HD-73 protein produced in *Escherichia coli*. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-13171.
- Sammons, R.D., Sims, S., Bailey, C. e Leimgruber, R.M. 1994. Assessment of equivalence between *E. coli* produced and cotton-produced Btk HD-73 proteins and characterization of the cotton-produced Btk HD-73 protein. Relatório Técnico Monsanto St. Louis MSL-13170.
- 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.; Potrykus, I. 1997. Anwendungsbeispiele für die Gentechnik bei Lebensmitteln, transgene Nutzpflanzen. In: Gassen, H.G. & Hammes, W.P. Handbuch Gentechnologie Lebensmittell. 1^o Auflage, Hamburg - Behr Verlag.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Fietelson, J.; Zeigler, D.R. e Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 62: 775-806.
- Schulz, M.; Weissenböck, G. 1987. Dynamics of the tissue-specific metabolism of luteolin glucuronides in the mesophyll of rye primary leaves (*Secale cereale*) Z. Naturforsch. 43c: 187-193.
- Shadduck J.A. 1983. Some observations on the safety evaluation of non-viral microbial pesticides. Bull. W.H.O. 61: 117.
- Shelton, A.M.; Zhao, J.-Z.; Roush, R.T. 2002. Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. Annu. Rev. Entomol. 47: 845-881.
- Siegel J.P.; Shadduck, J.A.; Szabo, J. 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. J. Econ. Entomol. 83: 717-723.
- Siegel, J.P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. Journal of Invertebrate Pathology. 77. p. 13-21.
- Siegel, J.P.; Shadduck, J.A. 1989. Safety of microbial insecticides to vertebrates and humans. In: Safety of Microbial Insecticides. CRC Press, Inc., FL. pp 101-113.
- Sims, S.; Martin, J. 1997. Effect of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry1A(b), Cry1A(c), Cry2A e Cry3A on *Folsomia candida* and *Xenylla grisea* (Insecta: Collambola). Pedobiologia. 41: 412-416.
- Sims, S.R. 1995. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Cry1Ac) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. Southwestern Entomologist 20: 493-500.
- Sims, S.R. 1997. Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* protein: effects on Lepidoptera, Diptera and non-target arthropods. Southwestern Entomology 22: 395-404.
- Sims, S.R.; Ream, J.E. 1997. Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry2A insecticidal protein within transgenic cotton tissue: laboratory microcosm and field studies. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 1502-1505.
- Sims, S.R.; Berberich, S.A.; Nida, D.L.; Segalini, L.L.; Leach, J.N.; Ebert, C.C.; Fuchs, R.L. 1996. Analysis of expressed proteins in fiber fractions from insect-protected and glyphosate-tolerant cotton varieties. Crop Sci. 36(5): 1212-1216.
- Sjoblod, R.D.; McClintock, J.T.; Engler, R. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 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.
- Tang, M.; Huang, K.; Li, X.; Zhou, K.; He, X.; Luo, Y. 2006. Absence of effect after introducing *Bacillus thuringiensis* gene on nutritional composition in cottonseed S38. Journal of Food Science. 71(1). Published on Web 1/10/2006
- Tannock, G.W. 1995. Normal Microflora. Chapman & Hall.
- Tapp, H.; Stotzky, G. 1995. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. Appl. Environ. Microbiol. 61(5): 1786-1790.

- Tapp, H.; Stotzky, G. 1998. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurtaski* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied Environmental Microbiology*. 61: 1786-1790.
- 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.
- Torres, J.; Ruberson, J. 2006a. Spatial and temporal dynamics of oviposition behavior of bollworm and three of its predators in Bt and non-Bt cotton fields. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 120(1): 11-22.
- Torres, J.; Ruberson, J. 2006b. Interactions of Bt-cotton and the omnivorous big-eyed bug *Geocoris punctipes* (Say), a key predator in cotton fields. *Biological Control*. 39: 47-57.
- Torres, J.B.; Ruberson, J.R. 2007. Abundance and diversity of ground-dwelling arthropods of pest management importance in commercial Bt and non-Bt cotton fields. *Annals of Applied Biology*. 150(1): 27-39.
- US EPA. 1986. EPA Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *israelensis* and *aisawai*.
- US EPA. 1988. Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing *Bacillus thuringiensis* as the Active Ingredient. NTIS PB 89-164198.
- US EPA. 1996. EPA pesticide Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain EG7841.
- US EPA. 1998. R.E.D. Facts - *Bacillus thuringiensis*. EPA-738-F-98-001. (www.epa.gov)
- 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.
- US Pharmacopeia. 1995. United States Pharmacopeia, Vol. 23. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Van Elsas, J.D.; Pereira, M.T.P.R.R. 1986. Occurrence of antibiotic resistance among bacilli in Brazilian soils and the possible involvement of resistance plasmids. *Plant and Soil*. 94: 213-226.
- Van Rie, J.; Jansens, S.; Höfte, H.; Deghelle, D.; Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1378-1385.
- 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.
- West, A.W. 1984. Fate of the insecticidal proteinaceous parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 16: 357-360.
- Whiteley, H.R.; Schnepf, H.E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 549-576.
- WHO. 1993. Health aspects of marker genes in genetically modified plants. Report of a WHO Workshop. 32 p.
- Wozniak, C.A.; Owens, L.D. 1994. Native β -glucuronidase activity in sugarbeet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.* 90: 763-771.
- Wu, K.; Lin, K.; Miao, J e Zhang, Y. 2006. Field abundances of insect predators and insect pests on δ -endotoxin-producing transgenic cotton in northern China. *Second International Symposium on Biological Control of Arthropods*. 363-369.
- Yu, L.; Berry, R.E.; Croft, B.A. 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppianitens* (Acari: Oribatidae). *J. Econ. Entomol.* 90(1): 113-118.

Tabela 1. Nível de efeito não observado (NOEL) de preparações microbianas de *B. thuringiensis* contendo as proteínas Cry2A.

SUBSTÂNCIA TESTE	MODELO ANIMAL	NOEL ²	REFERÊNCIAS
Estudos de toxicidade oral aguda			
Crymax	Ratos	> 2,5-2,8 x 10 ⁸ CFU/rat	Carter e Liggett, 1994
Crymax	Ratos	> 5050 mg/kg	US EPA, 1996
Cutlass OF	Ratos	> 10 ⁸ CFU/rato	David, 1989
Dipel	Ratos	> 2670 mg/kg	US EPA, 1996
Dipel	Ratos	> 3,4 x 10 ¹¹ esporos/kg	US EPA, 1986
Dipel	Ratos	> 4,7 x 10 ¹¹ CFU/kg	US EPA, 1986
Dipel	Ratos	> 5000 mg/kg	US EPA, 1986
Dipel	Coelhos	> 2 x 10 ⁹ esporos/animal	US EPA, 1986
Dipel	Coelhos	> 6,9 x 10 ⁷ esporos/kg	US EPA, 1986
Estudos de toxicidade oral subcrônica			
Dipel	Ratos	> 8400 mg/kg/dia/90 dias	McClintock et al., 1995
Dipel	Ovelhas	> 10 ¹² esporos/dia/153 dias	Hadley et al., 1987
Dipel	Ratos	1,3 x 10 ⁹ esporos/kg/dia	McClintock et al., 1995
Estudo de toxicidade oral crônica			
Dipel	Ratos	8400 mg/kg/dia/2 anos	McClintock et al., 1995
Estudo de toxicidade oral humana			
Dipel	Humanos	> 1000 mg/dia/3 dias	McClintock et al., 1995; US EPA, 1986

¹ Crymax: Cry2A, Cry1Ac, Cry1C; Cutlass OF: Cry2A, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac; DIPEL: Cry2A, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac.

² Esses NOELs são as doses mais altas testadas (expressas em várias unidades como mg de ingrediente técnico/kg de peso corporal, ou mas comumente CFU ou esporos/animal ou kg de peso corporal. Não é possível comparar doses diretamente numa base de mg de material técnico/kg de peso corporal, pois as unidades formadoras de colônia (CFU) ou a contagem de esporos podem variar de aproximadamente 10⁸ a 10¹¹ por grama de material bacteriano técnico (McClintock et al., 1995)). O conteúdo de proteínas Cry em diferentes preparações de *Bt* pode variar dependendo do microrganismo ou das condições de fermentação. As doses de Cry2A administradas a animais nos estudos acima variaram de mg a g/kg de peso corporal.

Tabela 2. Resumo dos estudos de segurança para as proteínas Cry2Ab e Cry2Aa.

ESTUDO	PROTEÍNA	RESULTADOS
Degradação em sistema digestivo <i>in vitro</i>	Cry2Ab	Meia vida <15 segundos em SGF ¹ ; digerido ao núcleo trípico estável no SIF ²
	Cry2Aa	Meia vida <15 segundos em SGF ¹ ; digerido ao núcleo trípico estável no SIF ²
Similaridade com seqüências alergênicas	Cry2Ab	Sem homologia com alérgenos protéicos
	Cry2Aa	Sem homologia com alérgenos protéicos
Similaridade com seqüências tóxicas	Cry2Ab	Sem homologia com toxinas conhecidas ou outras proteínas de preocupação para a saúde humana
	Cry2Aa	Sem homologia com toxinas conhecidas ou outras proteínas de preocupação para a saúde humana
Degradação em sistema digestivo <i>in vitro</i>	Cry2Ab	Meia vida <15 segundos em SGF ¹ ; digerido ao núcleo trípico estável no SIF ²
	Cry2Aa	Meia vida <15 segundos em SGF ¹ ; digerido ao núcleo trípico estável no SIF ²
Toxicidade oral aguda em camundongos	Cry2Ab	Sem efeitos na mais alta dose testada 1.450 mg/kg ³
	Cry2Aa	Sem efeitos na mais alta dose testada 4.011 mg/kg

¹ SGF = fluido gástrico simulado;
² SIF = fluido intestinal simulado;
³ Solubilidade da Cry2Ab no veículo de dose foi menor que da Cry2Aa.

Tabela 3. Dados de toxicidade do *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Colocar uma coluna referente à margem de segurança (Qtas vezes maior que a com encontrada no Bollgard ou derivados????)

ESPÉCIE	EXPOSIÇÃO	EFEITO
Humanos	Dose oral aguda (1 g/dia, 3 dias)	Sem efeito ou infectividade
Ratos	Dose oral aguda	LD ₅₀ ¹ ≥ 4,7 X 10 ¹¹ esporos/kg
Ratos	Dose oral aguda	LD ₅₀ ≥ 2,67 g/kg
Camundongos	Dose oral aguda (10.000 mg/kg)	Sem efeito
Coelhos	Dose oral aguda	LD ₅₀ ≥ 2,0 X 10 ⁹ esporos/animal
Cães	Dose oral aguda (10.000 mg/kg)	Sem efeito
Coelhos	Dose dérmica aguda (Dipel 6AF [®])	LD ₅₀ > 2.000 mg/kg
Ratos	Dose de inoculação aguda	LD ₅₀ ≥ 3,4 X 10 ¹¹ esporos/kg
Coelhos	Dose de inoculação aguda	LD ₅₀ ≥ 6,9 X 10 ⁷ esporos/kg
Ratos	Dose de inoculação aguda	LD ₅₀ ≥ 8,0 X 10 ¹¹ esporos/kg
Ovelhas	Dieta oral (500 mg/kg/dia Dipel D [®] ou Thuricide-HP [®] durante 5 meses)	Sem toxicidade ou efeito relacionado ao tratamento
Aves	Dose oral aguda	LD ₅₀ = 178 ppm, NOEL ² = 1ppm
Codornas	Dose oral aguda	LD ₅₀ > 10.000 g/kg
Pato	Dose oral aguda	LD ₅₀ > 2.000 mg/kg
Truta Arco-íris	Exposição de 96 horas	NOEL > 1.000 ppm
Truta Arco-íris	Exposição de 96 horas	LC ₅₀ ³ > 10 mg/L
<i>Bluegill sunfish</i> (<i>Lepomis macrochirus</i>)	Exposição de 96 horas	LC ₅₀ > 95 mg/L
Truta Arco-íris <i>Bluegill sunfish</i> <i>Sheepshead minnow</i> (<i>Cyprinodon variegatus</i>)	30 dias, concentração 100X maior que a exposição ambiental máxima esperada de Dipel	Sem efeitos adversos

¹ LD: dose letal.
² LC: Concentração letal.
³ NOEL: nível de efeito não observado.
Adaptado de JOUNG e CÔTÉ, 2000

Tabela 4. Resumo dos estudos com a proteína Cry2Ab2 em organismos não-alvo.

ORGANISMO	RESULTADO	MATERIAL TESTADO	CONCLUSÕES ¹ REFERÊNCIAS
Abelha melífera adulta	NOEC ² = 68 µg Cry2Ab2/ml de dieta	Proteína Cry2Ab2 purificada de <i>E. coli</i>	NOEC > 56X máxima concentração de Cry2Ab2 prevista em algodão (Maggi, 2000a)
Larva de abelha melífera	NOEC = 170 µg Cry2Ab2/ml, dose única	Proteína Cry2Ab2 purificada de <i>E. coli</i>	NOEC > 139X máxima concentração de Cry2Ab2 prevista em algodão (Maggi, 2000b)
Joaninha	NOEC = 4500 µg Cry2Ab/ml de dieta	Proteína Cry2Ab2 purificada de <i>E. coli</i>	NOEC > 88X máxima concentração de Cry2Ab2 prevista em folha de algodão (Palmer e Krueger, 2000c)
Colêmbola	NOEC = 69,5 µg Cry2Ab/g de dieta	Folhas de MON 15985	NOEC > 17X máxima exposição ambiental prevista para a proteína Cry2Ab2 de algodão em solo
Larva de lixeiro	NOEC = 1100 µg Cry2Ab/g de dieta	Proteína Cry2Ab2 purificada de <i>E. coli</i>	NOEC > 22X máxima exposição ambiental prevista para a proteína Cry2Ab2 em folha de algodão (Palmer e Krueger, 2000a)
Parasita himenóptero (vespa)	NOEC = 4500 µg Cry2Ab/ml de dieta	Proteína Cry2Ab2 purificada de <i>E. coli</i>	NOEC > 3700X máxima exposição ambiental prevista para a proteína Cry2Ab2 em pólen de algodão (Palmer e Krueger, 2000b)
Minhoca	NOEC = 330 mg Cry2Ab2/kg de solo seco	Proteína Cry2Ab2 purificada de <i>E. coli</i>	NOEC ≥ 83X máxima exposição ambiental prevista para a proteína Cry2Ab2 de algodão em solo (Palmer e Krueger, 2000d)

¹Cálculos foram baseados com base no mais alto valor de expressão determinado em tecido de folhas da safra, pólen ou solo, como apropriado para a exposição do animal teste.

²NOEC = Concentração de efeito não observado.

Tabela 5. Resumo dos estudos com a proteína Cry1Ac em organismos não-alvo.

MATERIAL TESTADO	ORGANISMO	NOEL	REFERÊNCIAS
Proteína Cry1Ac purificada	Joaninha (<i>H. convergens</i>)	20 ppm	Palmer e Beavers, 1993a
	Parasitóide himenóptero (<i>N. vitripennis</i>)	20 ppm	Palmer e Beavers, 1993b
	Crisopídeo (<i>C. carnea</i>)	20 ppm	Palmer e Beavers, 1993c
	Larva de abelha melífera (<i>A. mellifera</i>)	20 ppm	Maggi, 1993a
	Adulto de abelha melífera (<i>A. mellifera</i>)	20 ppm	Maggi, 1993b
	Colêmbola (<i>F. candida</i> e <i>X. grisea</i>)	200 µg/g	Sims e Martin, 1997
Folhas de algodão Bollgard® (expressa Cry1Ac)	Colêmbola (<i>F. candida</i>)	0,4 g folha/g solo	Yu et al., 1997
	Traça (<i>O. nitens</i>)	0,4 g folha/g solo	Yu et al., 1997