

Figura V.29. (A) Número de cópias de RNA mensageiro do gene *cel1*. (B) Número de cópias de RNA mensageiro do gene *nptII*.

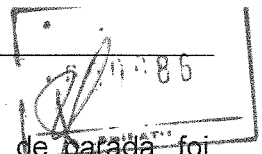
Os resultados obtidos foram consistentes entre as triplicatas biológicas indicando que a estimativa de número de cópias de RNA mensageiro de *cel1* e *nptII* está condizente. A expressão do gene *nptII* é mais uniforme entre as amostras do que a expressão do gene *cel1*, que sobressai em amostras de folhas jovens e cultura de tecidos. Expressão não foi detectada em amostras do controle convencional (clone SP530) e em amostras de bolotas de pólen de abelhas.

10.5. Clonagem do gene *cel1* e purificação da proteína

O gene *cel1* foi clonado em células de *Escherichia coli*, uma vez que a obtenção de quantidades representativas da proteína Cel1 a partir da extração de tecidos de plantas do evento H421 é inviável. A proteína recombinante purificada de *E. coli* foi produzida para ser utilizada como padrão nas análises de proteínas e, eventualmente para uso nos ensaios toxicológicos. Uma vez que a expressão da proteína Cel1 em tecidos do evento H421 foi muito baixa, decidiu-se pela aplicação de estudos toxicológicos a partir da exposição de organismos indicadores diretamente aos tecidos (folhas e pólen) e derivados (mel e bolotas de pólen) do eucalipto geneticamente modificado evento H421, uma vez que estes são os produtos que, de fato, estão disponíveis no ambiente e passíveis de exposição aos organismos.

Para a clonagem, um fragmento de DNA de cerca de 1,5 kb (bases 1 - 1479, GenBank: AY074552.1) contendo o cDNA do gene *cel1* (Shani *et al.* 1997),

EM BRANCO



começando no códon de início da tradução e finalizando no códon de parada, foi clonado no vetor de expressão pET3d (Novagen, Inc., Madison, WI). Iniciadores (primers) de PCR contendo um sítio de restrição da endonuclease Nco I na extremidade 5' e um sítio de restrição de Bam HI na extremidade 3' do cDNA foram utilizados para amplificar o DNA (sítios de restrição sublinhados):

Primer da extremidade 5': 5'-aaaCCATGGCCGGTCACGATTACC-3' (p513),
Primer da extremidade 3': 5'-aaaGGATCCTCATCGCCAAGTAG-3' (p512).

O produto da PCR foi clonado no sítio Nco I/Bam HI sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase no vetor denominado pETcel1. A sequência foi confirmada e o plasmídeo transformado em *E. coli* cepa BL21 (DE3) (New England Biolabs Inc.) para expressão de Cel1. Esta expressão foi essencialmente conduzida usando o protocolo do sistema pET para *E. coli* BL21. As proteínas extraídas das bactérias foram finalmente ressuspensas em PBS e analisadas por SDS-PAGE 10 %, de acordo com o procedimento para Western blot descrito anteriormente, sendo visualizadas com corante Coomassie. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e a maior banda (~50 kDa) foi recortada, eluída e sua sequência confirmada como a de Cel1 por espectrometria de massa – MS. A concentração da proteína foi determinada usando-se o kit BCA (Pierce, Thermo).

A indução da expressão de Cel1 no sistema pET é demonstrada na **Figura V.30**, na qual a quantidade de proteína total aumentou após a indução com IPTG e, especialmente, a banda maior de ~50 kDa, representando a proteína Cel1, como a principal proteína expressa.

EM BRANCO

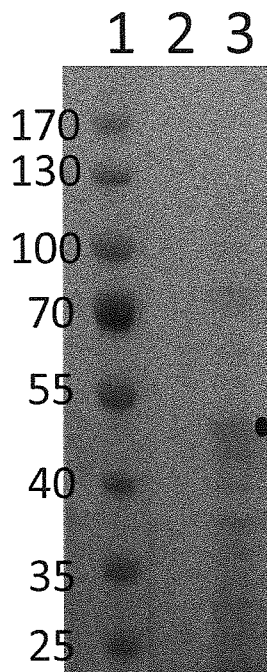
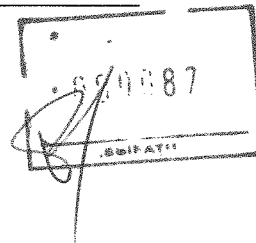


Figura V.30. Corante Azul Coomassie antes e depois da indução com IPTG. A banda marcada com ponto preto representa a proteína Cel1. Linha 1: Marcador de proteína (kDa) - Page Ruler, escala de proteína precorada, Thermo Scientific, 26617; Linha 2: Antes da indução; Linha 3: Expressão da proteína em seguida da indução por IPTG.

A sequência da proteína da principal banda após a indução foi analisada por espectrometria de massa e identificada como Cel1 (AtCEL1) (NCBI accession number NP_177228). Os seguintes peptídeos de AtCEL1 foram identificados:

36 SILFFEGQR 44
64 DGSSAGVDLSGGYYDAGDNIK 84
268 AGDTINEFGWDNKHAGINVLISK 290
362 VVPCGELTASPSLLR 376

Na **Figura V.31**, esses peptídeos foram alinhados com a sequência da proteína Cel1 de *Arabidopsis thaliana* (AtCel1 - número de acesso no NCBI NP_177228) e à endoglucanase homóloga mais próxima de eucalipto (EgCel1 - acesso no Phytozome número Eucgr.B02944 - <http://www.phytozome.net/>). A análise de homologia provou que AtCEL1 foi induzida e expressa conforme o esperado.

EM BRANCO

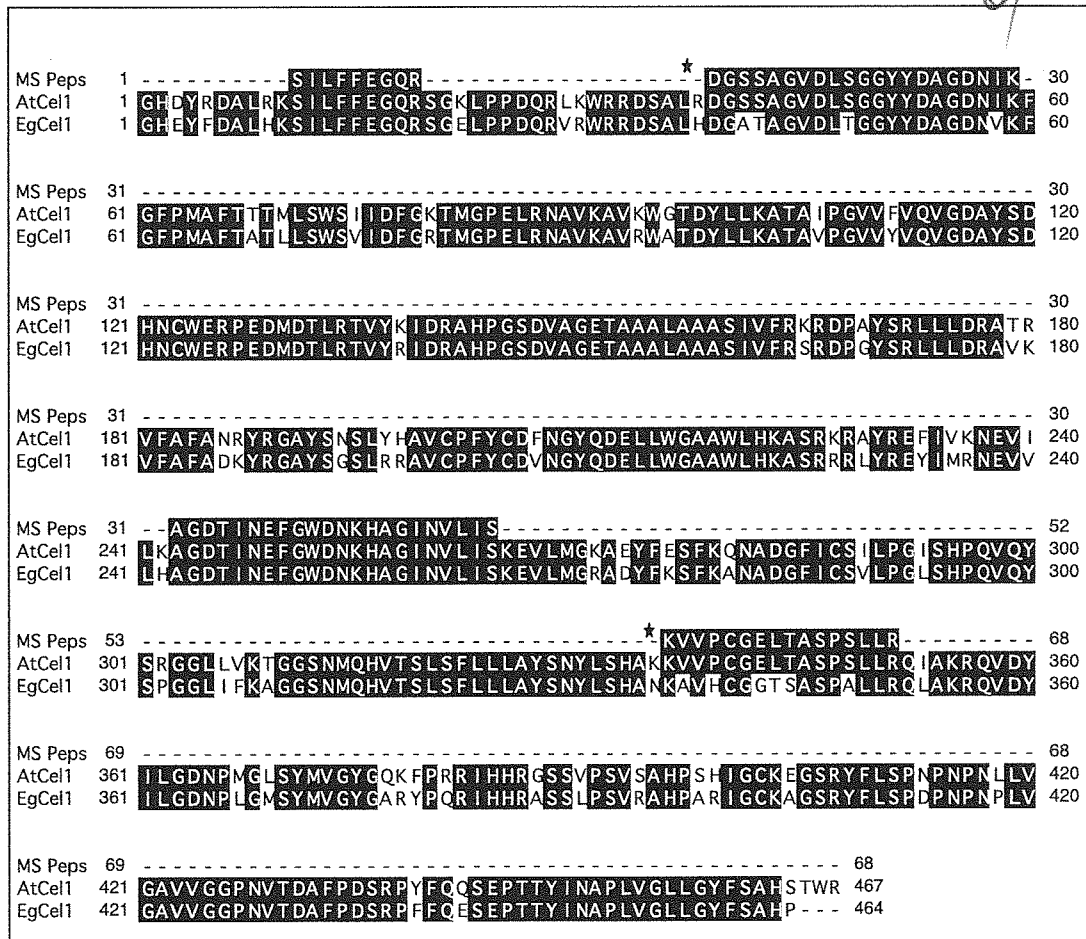


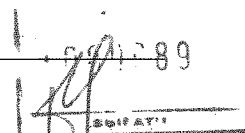
Figura V.31: Alinhamento entre Cel1 de Eucalyptus (EgCel1), Cel1 de Arabidopsis thaliana (AtCEL1), e os peptídeos identificados por espectrometria de massa (MS_peps). Os peptídeos exclusivos de AtCel1 estão marcados com asterisco.

11. As técnicas de detecção gerais e específicas do OGM, apresentando metodologia pertinente.

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase - PCR pode ser aplicada para a detecção e identificação do DNA inserido, já que os iniciadores (*primers*) utilizados na reação são desenhados para a identificação específica da construção ou do evento. A técnica de ELISA geralmente pode ser utilizada para a detecção e quantificação individual das proteínas expressas especificamente por um produto geneticamente modificado. No caso do eucalipto H421, como o nível de expressão das proteínas é muito baixo, situando-se muito próximo do limite de detecção do método em alguns tecidos, recomenda-se a utilização da técnica de PCR. Esta técnica pode ser utilizada para identificar as plantas de eucalipto geneticamente modificado evento H421, contendo os genes *cel1* e *nptII*.

A Reação em Cadeia de Polimerase - PCR é uma técnica criada em 1983 (Mullins *et al.*, 1994) bem conhecida e difundida em várias áreas da biologia, agronomia, medicina e outras, e tem como algumas de suas vantagens a alta sensibilidade e especificidade (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Gama, 1998). A base deste método de detecção de organismos geneticamente modificados está na

EM BRANCO



identificação de elementos genéticos específicos presentes nos cassetes genéticos introduzidos no organismo, independente da metodologia de transformação utilizada. Para a detecção específica das construções (*cassetes*) presentes no eucalipto evento H421, os iniciadores (*primers*) específicos devem reconhecer sequências dos genes *cel1* ou *nptII*, com partes dos seus elementos reguladores respectivos, promotores ou terminadores. Essas sequências estão descritas anteriormente no presente documento (na caracterização molecular do eucalipto evento H421). Para a identificação específica do evento H421, são utilizados *primers* que se anelam às regiões do genoma original do eucalipto que flanqueiam a inserção contendo os genes da transformação e às regiões próximas da borda do inserto.

Os iniciadores, diretos e reversos, para detecção da construção específica, com os respectivos tamanhos dos fragmentos gerados por PCR, são os seguintes:

Cassete de expressão *cel1* – 1684 pb:

Cel-F (direto) - CCAGGCCAGCACTAAAGAAG
TNOS-R (reverso) - AAGACCGGCAACAGGATTC

Cassete de expressão *nptII* – 1401 pb:

NPTII-F (direto) - GCTTGGGTGGAGAGGCTATT
TNOS-R (reverso) - CCCGATCTAGTAACATAGATG

Os pares de iniciadores para a detecção específica do evento H421, que amplificam fragmentos localizados nos pontos de inserção do transgene no genoma do eucalipto, com os respectivos tamanhos dos fragmentos gerados por PCR, são os seguintes:

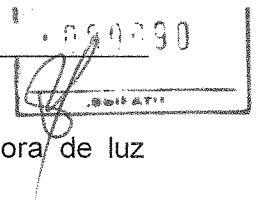
Lado direito da inserção – 2561 pb:

p414_Cel1 5' GSPb-R - GCGGTTCTGTCAGTTCCAAACGT
p439_Euc to RB Cel1-1 - TTGCTATGGGCTTTGTGG

Lado esquerdo da inserção – 1913 pb:

p412_Cel1 3' GSPc-F - TGTTGCCCGTCTCACTGGTGAA
p1007-R - AGGATATTCGCGGTCTGAAC

As reações de PCR para um volume final de 14 µl são compostas por 6,6 µl de *Master Mix* (Promega), 0,4 µl de iniciador direto (*primer forward*) (10 mM), 0,4 µl de iniciador reverso (*primer reverse*) (10 mM), 2,0 µl de DNA e completando-se o volume final com 4,6 µl de água destilada deionizada. A etapa de amplificação é realizada em termociclador com o seguinte programa: 1 ciclo de 5 min a 94 °C; 35 ciclos compostos por períodos de 35 seg a 94 °C, seguido por 45 seg a 60 °C e 1 min a 72 °C; finalizando com 1 ciclo de 10 min a 72 °C. O produto é revelado por eletroforese em gel de agarose, utilizando corante com afinidade por fitas de DNA (como Sybr Green



ou brometo de etídio, por exemplo), visualizado em mesa transiluminadora de luz ultravioleta.

12. O padrão de herança genética dos genes inseridos.

A significância do padrão de segregação foi avaliada pela análise de Qui-quadrado (X^2) em progênies (F_1) do eucalipto evento H421, produzida por polinização controlada, realizada em casa de vegetação, com pólen de dois outros genitores (BA0869 e BRASUZ) em separado, para determinar a herdabilidade da característica (presença do *nptII*). Após a polinização controlada, período de maturação dos frutos e processamento das sementes (cerca de quatro meses), foram produzidas as mudas em tubetes das referidas progênies, no interior de casa de vegetação, para a retirada de amostras de tecido foliar, com a finalidade de avaliar, via reação de PCR qualitativo, a presença do gene *nptII*. A FuturaGene Brasil possui o reconhecimento em Boas Práticas Laboratoriais do INMETRO (Instalação de Teste 0040) em seu laboratório de biologia molecular, para estudos de detecção qualitativa do gene *nptII* via PCR Clássico (INMETRO, 2013) e as avaliações do estudo de segregação, embora não tenham sido feitas em BPL, utilizaram a mesma estrutura técnica e profissional, sendo utilizada como marcador genético, a sequência do gene *nptII*, cuja sequência alvo está descrita no banco de dados do *GenBank* sob o número de acesso AF269238, sob o controle do terminador NOS, que faz parte da construção do evento H421.

As plantas F_1 foram geradas por cruzamentos do eucalipto evento H421 (parental materno) com as matrizes convencionais BA0869 e BRASUZ, utilizadas como doadoras de pólen (parental paterno). Da população de plantas F_1 produzidas, avaliações foram realizadas para presença do gene *nptII*, utilizando análise de PCR. As progênies derivadas dessa planta apresentaram os padrões esperados para a segregação genética.

A análise de Qui-quadrado é baseada em testar a razão de segregação observada com presença do inserto com a razão que é esperada de acordo com os princípios Mendelianos, conforme mostrado na **Tabela V.12**.

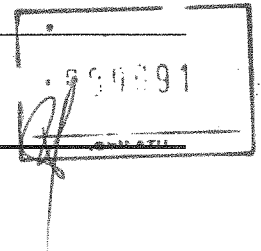
Tabela V.12. Cruzamentos utilizados nas análises de segregação do eucalipto evento H421.

Progenie ^a	Razão esperada	Comentário
H421 X BA0869F ₁	1:1	positivo:negativo (produto de polinização controlada)
H421 X BRASUZF ₁	1:1	positivo:negativo (produto de polinização controlada)

^a Para confirmar a segregação, dois cruzamentos foram realizados através de polinização controlada para produzir as progênies (F_1) avaliadas.

O teste de Qui-quadrado foi calculado conforme abaixo e com a utilização do Programa GENES (Cruz, 2006).

EN BRANCO



$$\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e]$$

Onde o = frequência observada do genótipo, e = frequência esperada do genótipo análise com um grau de liberdade.

Os resultados do teste de Qui-quadrado estão resumidos na **Tabela V.13**. Todos os valores de χ^2 indicaram que não existem diferenças significativas entre as razões genéticas observadas e esperadas em todas as gerações do Eucalipto H421 testadas. Esses resultados são consistentes com os dados de caracterização molecular que indicam um único local de inserção do cassete de expressão dos genes *nptII* e *cel1*, e mostram o padrão de herança genética dos genes introduzidos no eucalipto H421.

Tabela V.13. Análises de segregação do eucalipto evento H421.

Progênie	Número de plantas	Positivos observados ^a	Negativos observados	Positivos esperados ^b	Negativos esperados ^b	Qui-quadrado ^b	Probabilidade ^b
H421 X BA0869F ₁	64	30	34	32	32	0,25	61,70%
H421 X BRASUZF ₁	89	42	47	44,5	44,5	0,28	59,61%

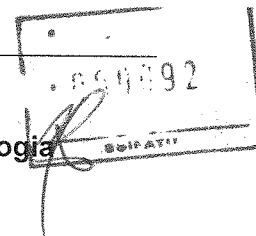
^a A confirmação da característica foi baseada no ensaio de PCR para detectar o gene *nptII* sob controle do terminador NOS.

^b Análise realizada e resultados obtidos através da utilização do programa GENES (Cruz, 2006).

13. A descrição dos efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos, quando observados.

Nenhum efeito pleiotrópico ou epistático foi observado no eucalipto evento H421 até o presente momento durante os experimentos em contenção, realizados desde sua obtenção em 2003, e a campo, realizados sob LPMA desde 2006 em diferentes locais. Diferenças significativas na composição e na morfologia do eucalipto H421 não foram encontradas quando comparado com o eucalipto convencional, exceto pela sua capacidade de crescer e produzir maior volume de madeira mais rapidamente, o que era o esperado, pela característica exógena introduzida na planta através da técnica de DNA recombinante, com transformação mediada por *Agrobacterium*. Além das avaliações conduzidas nos experimentos, o monitoramento pós-colheita também foi mantido nas áreas das Estações Experimentais da FuturaGene e o eucalipto H421 teve comportamento no ambiente semelhante ao do seu controle convencional, clone SP530, bem como das variedades convencionais de eucalipto utilizadas como referências comerciais.

EM BRANCO



14. O grau de estabilidade genotípica, especificando a metodologia utilizada e o número de gerações avaliadas.

Algumas ocorrências podem alterar a expressão de um evento de transformação genética nas suas progênes. A mais comum é o crossing-over, porém, elementos como quebras cromossômicas, rearranjos, inserções e a ação de elementos transponíveis e retrotransponíveis também são relevantes e devem ser considerados. Com isso em mente, faz-se importante a verificação da estabilidade de um evento transgênico após uma ou mais gerações.

Por meio da técnica de reação de polimerase em cadeia, utilizando iniciadores (*primers*) com sítios de anelamento em diferentes partes de um transgene e em seus flancos, é possível averiguar a integridade de todas as partes do transgene, bem como verificar se o loco no qual o mesmo foi inserido permanece inalterado. Sendo assim, foram realizados análises com o intuito de avaliar a estabilidade do evento de transformação H421 em progênie resultante do cruzamento de matrizes geneticamente modificadas do evento H421 e convencionais (variedade BA0869).

Para a realização dos experimentos foi utilizado material vegetal proveniente de 30 indivíduos da progênie resultante do cruzamento dos acessos H421 (GM) x BA0869 (convencional). As extrações de DNA foram realizadas de acordo com o procedimento operacional padrão elaborado para as Boas Práticas de Laboratório.

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 14 µl, sendo estas compostas por 6,6 µl de *Master Mix* (Promega), 0,4 µl de *primer forward* (10 mM), 0,4 µl de *primer reverse* (10 mM), 2 µl de DNA e completando o volume final com 4,6 µl de água destilada deionizada.

A fim de cobrir toda a extensão do inserto e verificar a sua estabilidade no loco inserido, foram utilizados quatro pares de *primers*, estando o par FGN31 – FGN32 anelando no cromossomo do eucalipto e à montante do inserto, respectivamente; seguido pelos pares 36-05 (anelando no gene *nptII* e terminador tNOS); 28-29 (anelando no gene *cel1* e terminador tNOS); e por fim, com o par de *primers* FGN39 – FGN43 estando localizado à jusante do inserto e no cromossomo do genoma do eucalipto, respectivamente.

Inicialmente foram realizados testes de amplificação, com quatro indivíduos pertencentes à progênie H421x BA0869. Após a realização dos testes as mesmas amplificações foram realizadas com 30 membros da mesma população. As combinações de *primers* utilizadas, as sequências dos *primers* e o tamanho dos amplicons esperados podem ser observados na **Tabela V.14**. A imagem dos fragmentos gerados por PCR estão na **Figura V.32**.

EM BRANCO

000093

Tabela V.14. Primers utilizados na avaliação da estabilidade do evento H421.

Região	Código do primer	Nome do primer	Sequência	Amplicon
RB	FGN 31	p414_Cel1 5' GSPb-R	GCGGTTCTGTCAGTTCCAAC GT	2561 pb
	FGN 32	p439_Euc to RB CEL1-1	TTGCTATGGGCTTTGTGG	
NPT II	36	NPTII-F	GCTTGGGTGGAGAGGCTATT	1401 pb
	05	T-NOSR	CCCgATCTAGTAACATAGATG	
Cel1	28	Cel-F	CCAGGCCAGCACTAAAGAAG	1684 pb
	29	TNOS-R	AAGACCGGCAACAGGATTC	
LB	FGN 39	p442-F	TGCTCACCGAATGGTACAGG	1391 pb
	FGN 43	p1007-R (LB)	AGGATATTCGCGGTCCAAC	

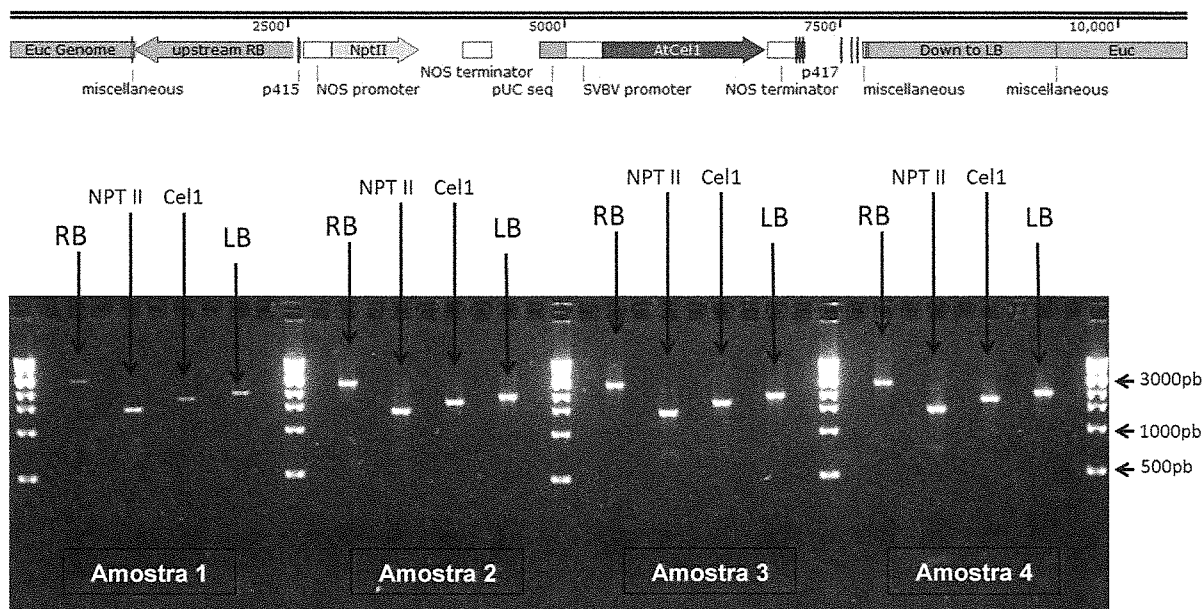


Figura V.32. Fragmentos de PCR produzidos pela amplificação das regiões do inserto (Borda Direita-RB; nptII; cel1, Borda Esquerda-LB) em quatro amostras de progênie do eucalipto evento H421, com esquema representativo da disposição dos elementos no inserto.

Por motivos práticos um dos *primers* da região da borda esquerda (LB) foi substituído pelo primer FGN 39. Esta substituição não interfere nos resultados das análises, uma vez que ambos possuem região de anelamento bem próximos, sendo que a combinação FGN 39–FGN 43 produz um amplicon ligeiramente menor (1391 pb contra os 1931 pb mostrados na Figura 2 acima).

Os indivíduos 1, 2, 3, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27 e 28 apresentaram bandas, com os pesos esperados, nas quatro combinações de *primers*, como pode ser observado na **Figura V.33**.

EM BRANCO

1994
FuturaGene

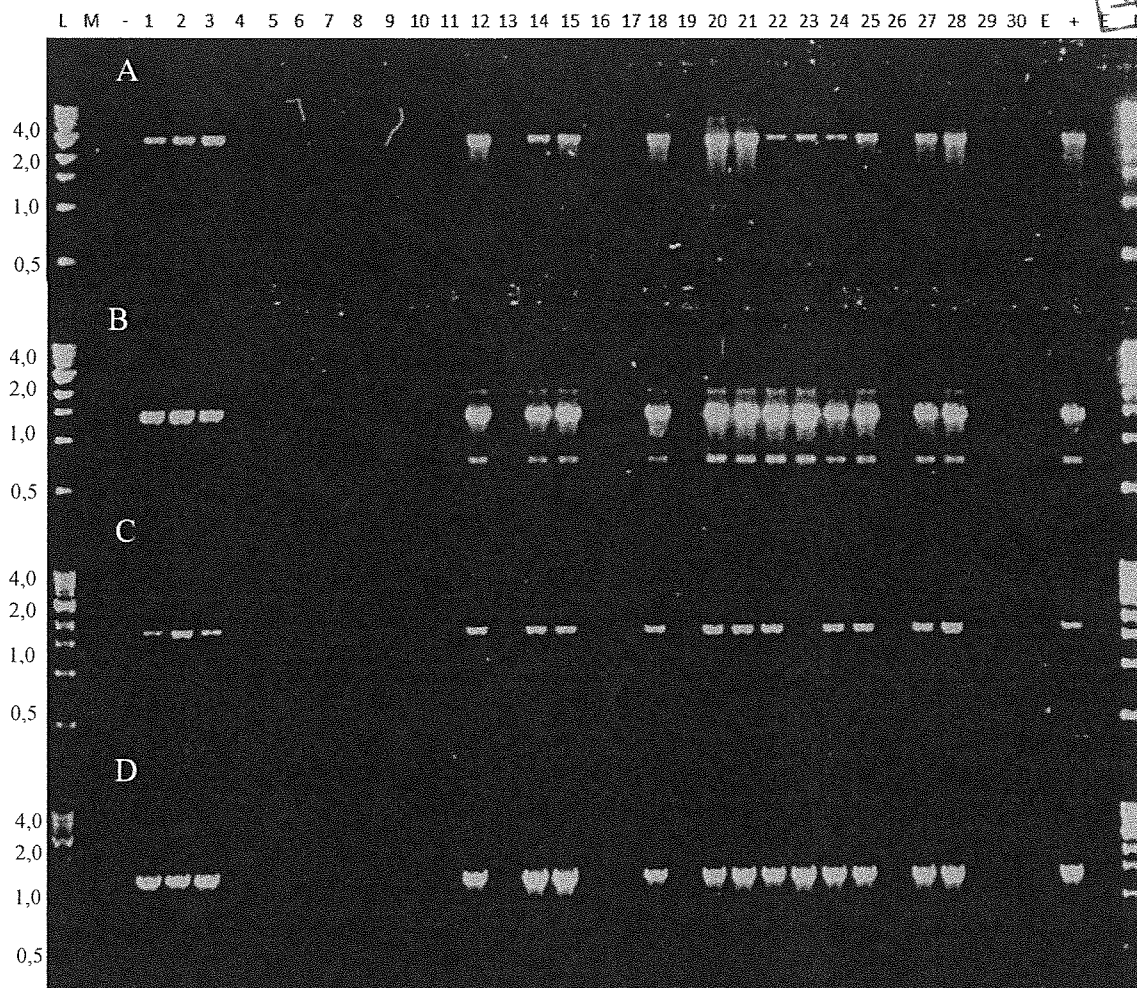


Figura V.33. Reação de PCR com 30 indivíduos da população, utilizando os quatro pares de primers: (A) Produto de amplificação da borda direita (RB), com o par de primers FGN 31 – FGN 32; (B) Produto de amplificação do gene *nptII/tNOS* com o par de primers 36 - 05. (C) Produto de amplificação do gene *cel1/tNOS*, com o par de primers 28 - 29. (D) Produto de amplificação da borda esquerda (LB), com o par de primers FGN 29 – FGN 43. (L) Ladder 1Kb, (M) Mix sem DNA, (-) : Controle negativo; (1-30) Identificação da amostra; (+) Controle positivo, (E) Canaleta vazia.

Os resultados mostram claramente a distribuição de plantas transformadas na progênie respeitando um padrão de segregação mendeliana esperado de 1:1, com o mesmo número de indivíduos positivos e negativos, sendo essa mais uma evidência de que a integração original do transgene no evento H421 se deu de forma única e não sofreu modificação nas suas características quando transferido para suas progênies.

15. A existência de interações com efeitos adversos, quando dois ou mais genes forem introduzidos no mesmo OGM, por técnicas de ADN recombinante e suas possíveis consequências.

O eucalipto evento H421 foi produzido pelo método de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando o vetor binário pBI121. O

plasmídeo contém uma região T-DNA com os cassetes de expressão dos genes *cel1* e *nptII*. A expressão dos genes *cel1* e *nptII* é regulada pelos promotores SVBV e Nos, respectivamente. Os genes introduzidos no eucalipto evento H421 expressam as proteínas Cel1 e NPTII.

A enzima Cel1 é uma endoglucanase de origem vegetal, isolada de *Arabidopsis thaliana*, que apresenta ação específica nas fibras da parede celular. Esta proteína apresenta alta similaridade com proteínas endógenas do eucalipto e com proteínas presentes em grande número de plantas, alimentícias ou não. A NPTII é uma enzima utilizada nas etapas de seleção das células transformadas, conferindo resistência a antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos. Esta ferramenta de seleção vem sendo utilizada em um grande número de transformações pela técnica de ADN recombinante, sem apresentar qualquer efeito adverso de interação com outros genes ou proteínas introduzidos em plantas geneticamente modificadas, aprovadas para cultivo e consumo humano ou animal.

A ausência de efeitos nas características fenotípicas das plantas transformadas, exceto pelo maior crescimento, com alta similaridade de composição obtida nas análises de tecidos, aliadas ao fato da expressão de ambas as proteínas ser bastante baixa na grande parte dos tecidos avaliados, permite inferir que não está havendo interações entre as proteínas expressa no eucalipto evento H421.

Os resultados obtidos nos testes toxicológicos com organismos indicadores provam que não existem efeitos adversos provocados pela presença ou interação dos novos genes, ou das proteínas recombinantes expressas, no eucalipto evento H421.

16. As modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos.

As características fenotípicas e as interações ecológicas do eucalipto H421 foram avaliadas em comparação ao seu controle convencional para estudar sua composição em diferentes parâmetros, sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos, bem como em relação ao potencial de se estabelecer como planta voluntária ou invasora. A 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). Essas avaliações incluíram a observação comparativa de 23 características de crescimento e desenvolvimento da planta, cinco parâmetros de germinação de sementes, três características do pólen além de observações para interações planta-inseto, planta-doença e planta-estresse abiótico. Os resultados indicaram que o eucalipto H421 não possui características que poderiam conferir um risco como planta invasora ou representar algum risco ecológico quando comparado ao eucalipto controle convencional ou a variedades comerciais convencionais. Os dados sobre interações ecológicas indicam que o eucalipto H421 não confere nenhuma suscetibilidade ou tolerância maior a doenças, ataque de insetos ou estresses abióticos em relação ao controle convencional, clone SUZ SP530. Os dados das análises de composição também demonstram a equivalência

EM BRANCO

096
AT

entre o eucalipto H421 e o eucalipto convencional clone SP530. Os resultados dos estudos realizados com pólen, da mesma forma, não mostram diferenças significativas entre a morfologia, a viabilidade e a germinação dos grãos do eucalipto H421 em relação aos grãos de pólen do clone convencional SP530. Um experimento desenhado para avaliar a capacidade de estabelecimento de plantas espontâneas, instalado em dois locais, de acordo com Liberação Planejada no Meio Ambiente aprovada pela CTNBio, também não apresentou qualquer diferença entre o número de plantas estabelecidas do eucalipto H421 e de seu controle convencional, o clone SP530. As características da madeira também foram avaliadas em relação à densidade, conteúdo de lignina e dimensões de fibras. Esses dados em conjunto suportam a conclusão de que o eucalipto geneticamente modificado evento H421 não apresenta maior risco de se tornar uma planta invasora ou de gerar significativa alteração no ambiente quando comparado ao eucalipto convencional.

16.1. Análises de composição com amostras coletadas no Brasil.

A composição de folhas do eucalipto geneticamente modificado evento H421 produzido em experimentos de campo em 4 regiões do Brasil foi analisada e comparada com o eucalipto controle convencional SUZ SP530, de constituição genética similar. Amostras de folhas coletadas em dois momentos, aos seis meses e com 1 ano de idade após o transplante no campo, foram analisadas para os componentes bromatológicos (cinzas, gordura, umidade, proteínas e carboidratos por cálculo). As épocas de coleta de amostras foram definidas em função da mudança de parâmetros fenotípicos, determinados nas Instruções para Execução dos Ensaio de Distinguidade, Homogeneidade e Estabilidade de Cultivares de Eucalipto, para fins de registro de variedade junto ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura (Brasil, DOU, Seção I, página 7, 04/02/2002), que também serviram de diretriz para a coleta dos dados de observações fenotípicas. As substâncias teste, controle e referências (T/C/R) foram produzidas em experimentos conduzidos sob Liberações Planejadas no Meio Ambiente entre os anos de 2011 e 2014, em quatro estações experimentais que fazem parte do CQB da FuturaGene Brasil: Angatuba, São Paulo; Araraquara, São Paulo; Caravelas, Bahia e Passagem Franca, Piauí, localizadas em regiões representativas do cultivo de eucalipto no país. As parcelas foram plantadas no delineamento de blocos ao acaso, com seis repetições. Duas variedades comerciais de eucalipto foram usadas como referências em cada local. Todos os campos foram cultivados utilizando-se as práticas florestais mais indicadas e adaptadas às respectivas regiões geográficas para a obtenção dos melhores índices de produtividade com os cuidados de preservação ao ambiente, em sistema de cultivo mínimo.

Um resumo das análises estatísticas foi gerado para cada componente bromatológico. As médias e os intervalos dos valores para os materiais são apresentados nas **Tabelas V.15 e V.16**, juntamente com os intervalos de dados de composição encontrados para as referências comerciais de eucalipto, que estabelecem os intervalos de valores possíveis para a cultura nas mesmas condições de desenvolvimento. As análises bromatológicas de composição foram conduzidas em instituição com reconhecimento pelo INMETRO em Boas Práticas de Laboratório - BPL, sendo todo o seu processo registrado e tendo todas as suas etapas rastreáveis.

EM BRANCO

15/03/2012
97
SIPATIS

Como mostrado na **Tabela V.15**, o conteúdo de cinzas aos seis meses de plantio ficou entre 3,82 e 6,31 g/100 g com a média de 5,02 g/100 g para o eucalipto H421 e entre 4,07 e 6,68 g/100 g, com a média de 5,40 g/100 g para o eucalipto controle convencional SP530. Os valores de carboidratos ficaram no intervalo de 66,75 a 77,27 g/100 g, com a média de 71,02 g/100 g para o eucalipto H421, e entre 64,82 e 75,35 g/100 g, com a média de 70,30 g/100 g para o controle SP530. O conteúdo de gorduras ficou dentro do intervalo de 5,71 a 8,19 %, com a média de 7,28 %, para o eucalipto H421 e de 6,67 a 8,08 %, com a média de 7,37 %, para o controle convencional SP530. O conteúdo de proteínas ficou dentro do intervalo de 13,09 a 20,85 g/100 g para o eucalipto H421, com a média de 16,98 g/100 g, e de 13,94 a 21,14 g/100 g, com a média de 17,23 g/100 g para o controle SP530. Os valores das médias das folhas do eucalipto aos seis meses de idade ficaram dentro dos intervalos de valores para os materiais de referência e não foi encontrada diferença significativa pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$) entre nenhum dos valores determinados para o eucalipto evento H421 em comparação com o seu controle convencional clone SP530.

Tabela V.15. Médias e intervalos de valores para bromatologia em folhas do eucalipto H421, eucalipto controle SP530 e referências comerciais – aos 6 meses de plantio, quatro locais, 2012.

Componentes Bromatológicos	H421 Média±DP (Intervalo)	SP530 Média±DP (Intervalo)	Referências Média±DP (Intervalo)
Carboidratos (g/100g)	71,02 ± 3,32 (66,75 - 77,27)	70,30 ± 3,43 (64,82 - 75,35)	69,35 ± 4,22 (62,31 - 78,74)
Umidade (% peso fresco)	38,66 ± 14,79 (15,15 - 55,50)	40,45 ± 15,37 (15,29 - 54,51)	37,75 ± 14,59 (15,28 - 57,92)
Proteínas (g/100g)	16,98 ± 2,53 (13,09 - 20,85)	17,23 ± 2,55 (13,94 - 21,14)	18,16 ± 2,97 (12,51 - 23,32)
Gorduras (g/100g)	7,28 ± 0,87 (5,71 - 8,19)	7,37 ± 0,38 (6,67 - 8,08)	6,63 ± 0,83 (5,16 - 8,14)
Cinzas (g/100g)	5,02 ± 0,79 (3,82 - 6,31)	5,40 ± 1,00 (4,07 - 6,68)	6,05 ± 1,25 (3,31 - 7,69)
Valor Energético (kcal/100g)	417,31 ± 7,95 (404,50 - 427,00)	415,44 ± 4,66 (409,50 - 422,75)	409,68 ± 5,49 (399,25 - 416,50)

Obs.: Não foram observadas diferenças significativas entre o eucalipto H421 e o clone convencional SP530 pelo Teste t de Student, ao nível de 5 % de probabilidade.

A **Tabela V.16** traz o conteúdo de cinzas com um ano de plantio, que ficou entre 3,53 e 7,44 g/100 g, com a média de 5,80 g/100 g para o eucalipto H421 e entre 3,66 e 7,63 g/100 g, com a média de 5,96 g/100 g para o eucalipto controle convencional SP530. Os valores de carboidratos ficaram no intervalo de 69,45 a 78,24 g/100 g, com a média de 73,71 g/100 g para o eucalipto H421, e entre 69,60 e 78,16 g/100 g, com a média de 73,52 g/100 g para o controle SP530. O conteúdo de gorduras ficou dentro do intervalo de 4,17 a 7,67 %, com a média de 6,18 %, para o eucalipto H421 e de

EM BRANCO

4798
BIOFARM

4,17 a 8,16 %, com a média de 6,33 %, para o controle convencional SP530. O conteúdo de proteínas ficou dentro do intervalo de 11,79 a 16,35 g/100 g para o eucalipto H421, com a média de 14,14 g/100 g, e de 11,19 a 15,94 g/100 g, com a média de 14,16 g/100 g para o controle SP530. Os valores das médias das folhas do eucalipto com um ano de idade ficaram dentro dos intervalos de valores para os materiais de referência e não foi encontrada diferença significativa pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$) entre nenhum dos valores determinados para o eucalipto evento H421 em comparação com o seu controle convencional clone SP530.

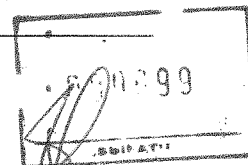
Os dados foram sumarizados com a determinação das médias e dos valores dos intervalos (mínimos e máximos) para cada componente de cada tratamento. Cada componente da substância teste foi comparado com o seu controle convencional. Análises estatísticas descritivas mostraram que as médias e os valores dos intervalos obtidos para cinzas, gorduras, umidade, proteínas, e carboidratos (por cálculo) para o eucalipto geneticamente modificado evento H421 foram similares aos valores determinados para o controle convencional clone SUZ SP530 e dentro, ou muito próximo, dos intervalos encontrados para as referências comerciais convencionais da cultura. Com base nesses resultados pode-se concluir que os componentes bromatológicos das folhas do eucalipto evento H421 em amostras colhidas no Brasil entre os anos de 2012 e 2013 são equivalentes ao eucalipto convencional. Estes são dados significativos na avaliação da segurança ambiental do eucalipto H421 e mostram sua equivalência substancial com as variedades convencionais de eucalipto normalmente plantadas nas áreas de produção da cultura.

Tabela V.16. Médias e intervalos de valores para bromatologia em folhas do eucalipto H421, eucalipto controle SP530 e referências comerciais – com 1 ano de plantio, quatro locais, 2012-2013.

Componentes bromatológicos	H421 Média (Intervalo)	SP530 Média (Intervalo)	Referências Média (Intervalo)
Carboidratos (g/100g)	73,71 ± 3,21 (69,45 - 78,24)	73,52 ± 3,00 (69,60 - 78,16)	74,48 ± 3,97 (68,84 - 79,23)
Umidade (% peso fresco)	27,82 ± 7,68 (19,75 - 41,38)	29,29 ± 8,68 (17,17 - 43,05)	24,00 ± 8,08 (12,95 - 41,74)
Proteínas (g/100g)	14,14 ± 1,56 (11,79 - 16,35)	14,16 ± 1,64 (11,19 - 15,94)	13,44 ± 1,73 (10,62 - 16,44)
Gorduras (g/100g)	6,18 ± 1,30 (4,17 - 7,67)	6,33 ± 1,41 (4,17 - 8,16)	5,75 ± 1,22 (4,03 - 7,97)
Cinzas (g/100g)	5,80 ± 1,56 (3,53 - 7,44)	5,96 ± 1,47 (3,66 - 7,63)	6,12 ± 1,72 (3,43 - 8,00)
Valor Energético (kcal/100g)	407,94 ± 8,06 (397,75 - 420,50)	407,59 ± 9,01 (395,00 - 422,00)	403,97 ± 5,55 (396,50 - 413,50)

Obs.: Não foram observadas diferenças significativas entre o eucalipto H421 e o clone convencional SP530 pelo Teste t de Student, ao nível de 5 % de probabilidade.

EM BRANCO



16.2. Características fenotípicas e florestais em condições de campo.

Na avaliação das características fenotípicas, florestais e das interações ecológicas do eucalipto H421, os dados foram coletados considerando-se os seguintes aspectos: 1) crescimento vegetativo; 2) parâmetros reprodutivos de flores/frutos e pólen; 3) germinação e dormência de sementes; 4) interações da planta com insetos, doenças e estresses abióticos. Uma visão geral das características avaliadas é apresentada na **Tabela V.17**.

As avaliações fenotípicas, florestais e das interações ecológicas são baseadas na combinação de experimentos de laboratório e estudos de campo conduzidos por pesquisadores com reconhecida competência na avaliação de plantas e/ou de eucalipto. Em cada uma dessas avaliações, o eucalipto H421 (referido como substância ou material teste) foi comparado com o eucalipto convencional SUZ SP530 (referido como material ou substância controle), com um *background* genético similar ao eucalipto H421, mas sem a característica de resistência a certas espécies de pragas lepidópteras. Adicionalmente, variedades comerciais (referidos como materiais ou substâncias referência) adaptadas às diferentes regiões de avaliação foram também empregadas para fornecer um intervalo de valores que são comuns à cultura comercial de eucalipto, para cada característica fenotípica, florestal e de interação ecológica avaliada.

Tabela V.17. Características fenotípicas, florestais e de interações ecológicas avaliadas para o eucalipto H421.

Características	Características medidas	Tempo de avaliação	Descrição da avaliação
Dormência/ Germinação	Dormência e germinação (laboratório)	Após 7 e 15 dias	% de sementes normalmente germinadas, germinadas anormais
Estágio vegetativo	Posição da lâmina foliar	6 meses	Escala 0-9, onde 0 = planta inteira seca e 9 = planta inteira verde
	Presença/Ausência de pecíolo	6 meses	Distância do solo (base da planta) à inserção da folha bandeira
	Dimensões/Forma da folha	6 meses	Comprimento e Largura do limbo; Relação C/L
	Coloração antociânica	6 meses	Índice de cor
	Cerosidade das folhas	6 meses	Índice de cerosidade
	Cor do ritidoma	1 ano	Índice de cor
	Cor da casca acima do ritidoma	1 ano	Índice de cor

EM BRANCO

100
100

Características	Características medidas	Tempo de avaliação	Descrição da avaliação
	Cerosidade na casca acima do ritidoma	1 ano	Índice de cor
Estágio reprodutivo	Início de florescimento	Floração	Formação de brácteas, aparecimento botões florais
	Formato do opérculo	Floração	% de umidade do grão colhido com casca
	Número de flores	Floração	
	Viabilidade do pólen	Antese	% do pólen viável
	Morfologia do pólen	Antese	Dimensões do grão de pólen

6.2.1. Observações fenotípicas em florestas

Experimentos de campo para avaliar as características fenotípicas do eucalipto geneticamente modificado evento H421 em comparação ao eucalipto convencional de mesmo background genético clone SUZ SP530 foram conduzidos entre os anos de 2011/2014 em quatro locais representativos do cultivo de eucalipto no Brasil. O desenho experimental foi de blocos totalmente ao acaso, com seis repetições em cada local, sendo eles: Angatuba, SP; Araraquara, SP; Caravelas, BA e Passagem Franca, PI. As substâncias de referência utilizadas foram, além do controle convencional clone SP 530, duas variedades comerciais de eucalipto convencional utilizadas comercialmente para cada uma das regiões produtoras, totalizando oito referências comerciais. O eucalipto H421 foi comparado com o controle em relação aos parâmetros constantes nas Instruções para Execução dos Ensaios de Distingibilidade, Homogeneidade e Estabilidade de Cultivares de Eucalipto, para fins de registro de variedade junto ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura (Brasil, DOU, Seção I, página 7, 04/02/2002).

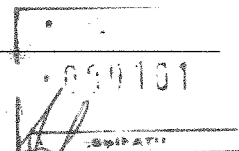
As observações foram realizadas nas plantas em determinados estágios de crescimento e localizadas em quatro diferentes campos de plantio. Cada observação foi realizada em, no mínimo, quatro plantas por tratamento por local, ou em oito partes de plantas (p.ex, dois ramos de cada uma das quatro plantas). Plantas atípicas foram desprezadas para efeitos de observação.

Foram observados os seguintes parâmetros:

Aos seis meses após plantio no campo

- Folha intermediária: posição da lâmina foliar:
 - Ereta – 1
 - Semi-ereta – 3
 - Horizontal – 5
 - Semi-pendente – 7

EM BRANCO



Pendente – 9

- Folha intermediária: pecíolo
Presença/ausência
Na presença, realizada a medição dos pecíolos.
Medição de 10 pecíolos por planta, de 5 plantas, de folhas do terço mediano de ramos retirados da parte intermediária da árvore.

- Folha intermediária: forma
Medição de comprimento e largura de 10 folhas, retiradas do terço mediano de ramos retirados da parte intermediária da árvore. Mesmos ramos da medição dos pecíolos.

- Folha intermediária: intensidade pigmentação antociânica: Ausente ou muito baixa - 1
Baixa - 3
Média - 5
Alta - 7
Muito Alta – 9

- Folha intermediária: cerosidade: Ausente ou muito baixa - 1
Baixa - 3
Média - 5
Alta - 7
Muito Alta - 9

Um ano após plantio no campo

- Tronco: cor predominante do ritidoma: cinza – 1
verde – 2
marrom – 3

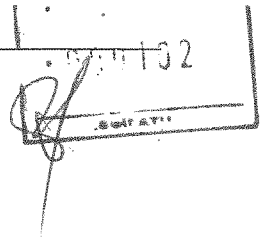
- Tronco: cor predominante da casca acima do ritidoma: creme – 1
cinza – 2
verde – 3
verde-azulada – 4
marrom – 5

- Tronco: cerosidade na superfície da casca acima do ritidoma
ausente – 1
presente – 2

Características para plantas adultas - ≥ dois anos de idade

- Ramo primário de um ano: forma da inserção no tronco
Em “V” invertida
Esférica

- Tronco: cor predominante do ritidoma: Creme
Cinza
Verde
Verde-azulada



Marrom

- Folha: posição da lâmina foliar: Ereta
Semi-ereta
Horizontal
Semi-pendente
Pendente

- Folha: comprimento da lâmina foliar
Determinar a média e registrar a maior e a menor medida de 50 folhas (10 folhas por planta de 5 plantas, retiradas do terço mediano de ramos intermediários da árvore)

- Folha: largura da lâmina foliar
Idem comprimento.

- Folha: forma
Adicionalmente, indicar a relação comprimento/largura das folhas, com a média e DP.

- Folha: intensidade da cor verde
Mais escura na face inferior - 1
Mesma intensidade em ambas as faces - 2
Mais escura na face superior - 3

- Folha: cerosidade
Ausente ou muito baixa - 1
Baixa - 3
Média - 5
Alta - 7
Muito Alta - 9

- Planta: ciclo até a primeira floração – considerar igualmente na comparação entre plantas GMs e convencionais o aparecimento de brácteas, emissão de botões, abertura de flores (antese).

- Inflorescência simples: número de botões por umbela

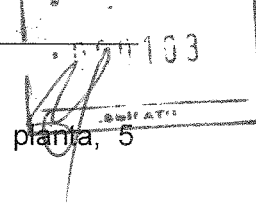
- Inflorescência: comprimento do pedúnculo
Medição com paquímetro ou régua de 50 inflorescências, 10 por planta, 5 plantas.

- Inflorescência: forma da seção transversal do pedúnculo

- Botão floral: formato do opérculo

- Fruto: comprimento do pedicelo

EM BRANCO



Medição com paquímetro de 50 pedicelos, 10 por planta, 5 plantas.

- Fruto: tamanho

Medição com paquímetro de 50 frutos, 10 por planta, 5 plantas.

- Fruto: forma

Relação comprimento/largura.

Na análise dos dados, considerando todos os locais combinados, em cada uma das idades - aos 6 meses e um ano após o plantio - não foram detectadas diferenças entre o eucalipto geneticamente modificado H421 e o eucalipto controle convencional SUZ SP530, para nenhuma das características fenotípicas avaliadas. Adicionalmente, o eucalipto H421 foi semelhante ao seu controle em relação ao número de dias para atingir a maturidade da cultura (florescimento) em dois dos locais avaliados (Angatuba/SP e Caravelas/BA), com cerca de um ano e dois meses de plantio no campo (variedades consideradas precoces). Nos outros dois locais (Araraquara/SP e Passagem Franca/PI) as plantas ainda não apresentaram florescimento.

A avaliação das observações de campo e dos dados coletados indicou que as características fenotípicas e as interações ecológicas do eucalipto H421 foram típicas do eucalipto cultivado no Brasil. O eucalipto H421 acompanhou os mesmos estádios de desenvolvimento que o eucalipto controle SP 530 nos locais avaliados. Os resultados de outras comparações fenotípicas do eucalipto H421 com o eucalipto controle convencional em cada um dos locais e entre os resultados combinados entre os quatro locais são apresentados nas **Tabelas V.18 e V.19**, respectivamente. Na análise combinada dos locais, somente uma diferença foi estatisticamente significativa entre o eucalipto H421 e o eucalipto controle convencional (**Tabela V.18**): a largura das folhas aos seis meses de plantio foi menor no eucalipto H421 em comparação ao eucalipto controle ($4,3 \pm 0,3$ vs. $4,6 \pm 0,3$ cm, respectivamente). Ambos os valores encontravam-se dentro do intervalo de valores estabelecido pelas referências comerciais e o mesmo parâmetro, avaliado mais tarde com 1 ano de idade, não apresentou diferença entre o eucalipto H421 e o seu controle convencional SP530 (respectivamente, $4,1 \pm 0,5$ e $4,3 \pm 0,8$ cm). Na análise de locais individuais, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre o eucalipto H421 e o eucalipto controle SP 530 para qualquer das características fenotípicas avaliadas (**Tabela V.19**). Como a diferença estatística detectada na análise dos locais combinados não foi detectada na análise de locais individuais, isso sugere que essas diferenças não foram indicativas de uma resposta consistente do eucalipto H421 associada com a característica e é improvável que esse resultado tenha algum significado biológico em termos de aumento do potencial do Eucalipto H421 impactar o ambiente ou de se estabelecer como planta daninha em comparação com o eucalipto controle convencional. Uma informação adicional relevante foi a observação do início do florescimento do eucalipto H421 juntamente com seu controle convencional SP530 com 1 ano de idade nas áreas de Angatuba – SP e Caravelas – BA. Este era esperado que ocorresse somente a partir dos dois anos de plantio da cultura, conforme o conhecimento prévio do material SP530. Este florescimento precoce ocorreu somente nos ramos mais altos de algumas plantas, igualmente em ambos os tratamentos, provavelmente em função dos extensos períodos de déficit hídrico ocorridos nas duas

EM BRANCO

101104
BIOFAT

áreas entre os meses de abril e novembro de 2012. Avaliações das interações ecológicas foram conduzidas como parte da caracterização do eucalipto H421 e são consideradas na análise de risco ecológico. As avaliações das interações ecológicas incluíram a coleta de dados e a comparação de respostas a estresses bióticos e abióticos do eucalipto H421 e do eucalipto controle convencional. Diferenças não foram observadas entre o eucalipto H421 e o eucalipto controle para as comparações das respostas das plantas a esses estresses.

Os parâmetros fenotípicos avaliados no estudo foram utilizados para caracterizar a planta e avaliar o potencial como planta daninha do eucalipto H421 em comparação ao eucalipto controle convencional. Esses dados são importantes na avaliação de risco ambiental do eucalipto H421. Com base nas características avaliadas, os resultados desse estudo suportam a conclusão de que o fenótipo e as interações ecológicas não foram alteradas entre o eucalipto H421 e o eucalipto controle convencional. Da mesma forma, o potencial para o eucalipto H421 se tornar uma planta daninha não foi aumentado em relação ao eucalipto controle convencional.

Tabela V.18. Comparação fenotípica combinada do eucalipto H421 com o eucalipto controle em quatro locais - 2012/2014 .

Características fenotípicas (unidades)	H421	Controle	Intervalo das referências ¹	
	Médias (DP)	Médias (DP)	Mínimo (DP)	Máximo (DP)
Posição da lâmina foliar	4,9	4,8	3,5	6,0
Pigmentação antociânica	2,3	2,3	1,0	6,0
Cerosidade	1,0	1,0	1,0	2,5
Cor do ritidoma	3,0	3,0	3,0	3,0
Cor da casca acima do ritidoma	3,5	3,5	1,0	5,0
Cerosidade casca acima do ritidoma	1,5	1,5	1,0	2,0
Pecíolo (cm)	1,1 (0,2)	1,1 (0,1)	1,1 (0,1)	2,0 (0,1)
Comprimento folha (cm) – 6 meses	10,5 (1,1)	10,7 (0,8)	9,3 (0,9)	15,0 (0,9)
Largura folha (cm) – 6 meses	4,3 (0,3)*	4,6 (0,3)	4,1 (0,3)	5,2 (0,3)
Comprimento folha (cm) – 1 ano	12,1 (1,4)	12,0 (1,5)	12,9 (1,3)	19,7 (1,7)
Largura folha (cm) – 1 ano	4,1 (0,5)	4,3 (0,8)	4,7 (0,3)	5,0 (0,4)

* Diferença significativa entre o eucalipto H421 e o controle SP530 pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).
¹ Intervalo = valores mínimos e máximos encontrados entre as 8 referências comerciais observadas.

099105

Tabela V.19. Comparação fenotípica do eucalipto H421 com o eucalipto controle por local, entre os anos de 2011/2014, Brasil.

Características fenotípicas	Locais	H421	Controle	
Posição da lâmina foliar	Angatuba SP	5,0	5,0	Horizontal
	Araraquara SP	4,8	4,6	Horizontal
	Caravelas BA	5,0	5,0	Horizontal
	Pass. Franca PI	5,0	5,0	Horizontal
Pigmentação antociânica	Angatuba SP	3,0	3,0	Baixa
	Araraquara SP	2,0	2,0	Muito Baixa
	Caravelas BA	2,0	2,0	Muito Baixa
	Pass. Franca PI	2,0	2,0	Muito Baixa
Cerosidade	Angatuba SP	1,0	1,0	Ausente
	Araraquara SP	1,0	1,0	Ausente
	Caravelas BA	1,0	1,0	Ausente
	Pass. Franca PI	1,0	1,0	Ausente
Cor do ritidoma	Angatuba SP	3,0	3,0	Marrom
	Araraquara SP	3,0	3,0	Marrom
	Caravelas BA	3,0	3,0	Marrom
	Pass. Franca PI	3,0	3,0	Marrom
Cor da casca acima do ritidoma	Angatuba SP	5,0	5,0	Marrom
	Araraquara SP	2,6	3,0	Verde
	Caravelas BA	3,0	3,0	Verde
	Pass. Franca PI	3,0	3,0	Verde
Cerosidade na casca acima do ritidoma	Angatuba SP	1,0	1,0	Ausente
	Araraquara SP	2,0	2,0	Presente
	Caravelas BA	1,0	1,0	Ausente
	Pass. Franca PI	2,0	2,0	Presente

Obs.: Não foram observadas diferenças significativas entre o Eucalipto H421 e o controle convencional SP530 pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$), para nenhuma das características avaliadas.

16.2.2. Qualidade da madeira e característica das fibras.

Cinquenta e seis baguetas de madeiras de eucalipto, retiradas de 28 árvores, sendo duas de cada árvore, foram fornecidas pela Futuragene. As duas baguetas de cada árvore foram analisadas conjuntamente no Laboratório de Celulose e Papel da Universidade Federal de Viçosa.

As baguetas de madeiras foram utilizadas para determinação de densidade básica da madeira, determinação do teor de lignina e medição de comprimento de fibras.

A densidade básica da madeira foi determinada pela relação entre o peso absolutamente seco e o volume saturado de pedaços de baguetas, utilizando-se o método da balança hidrostática estabelecido na norma ABNT NBR-11941 (1).

As baguetas foram transformadas em serragem, utilizando-se moinho Wiley. As serragens de madeira, após classificação em peneiras de malhas 40 mesh, foram acondicionadas em sala com umidade relativa e temperatura constantes (50 % e 23 °C, respectivamente) e, posteriormente, foram armazenadas em frascos hermeticamente fechados. As metodologias seguidas para as análises químicas das

EM BRANCO

madeiras foram as seguintes: Teores de Lignina Klason Insolúvel conforme descrito por Gomide e Demuner (1986); Teores de Lignina Klason Solúvel de acordo com Goldschmid (1971).

Na **Tabela V.20** estão apresentados os resultados da densidade básica e do teor de lignina das amostras de madeira em forma de baguetas. Por causa da pequena quantidade de madeira disponível para determinação de densidade básica, algumas amostras apresentaram grande variabilidade entre as duas repetições desta análise. Em condições normais de análise laboratorial, essas determinações deveriam ser repetidas, mas a disponibilidade limitada de material impossibilitou novas determinações. As outras amostras apresentaram variabilidade de densidade entre as duas repetições em níveis aceitáveis. As determinações dos teores de lignina solúvel e insolúvel apresentaram variabilidade dentro dos padrões normais de laboratório, apesar da pequena quantidade de material disponível.

Em relação à densidade da madeira, não foi observada diferença entre o eucalipto transformado e o controle convencional. Para o conteúdo de lignina, o valor médio da fração insolúvel mostrou-se significativamente maior para o evento H421, com $28,4 \pm 0,6$ % diante dos $27,5 \pm 1,1$ % determinados para o controle convencional clone SP530. Esta diferença refletiu no conteúdo total de lignina, que se apresentou também maior no eucalipto H421, com um teor médio de $32,2 \pm 0,6$ %, ante um valor médio de $31,6 \pm 1,1$ % encontrado para o eucalipto controle convencional SP530. Novas análises com madeiras oriundas de diferentes áreas de produção e em idades mais próximas do ponto de colheita poderão estabelecer com mais clareza se o conteúdo mais alto de lignina insolúvel é um fator local, uma vez que estas amostras foram coletadas em uma só área, ou se é uma característica do evento H421. Gomide et al. (2005), analisando dez clones de última geração das principais empresas brasileiras de celulose, a maior parte deles híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, encontraram valores médios para lignina insolúvel variando entre 22,4 e 28,6 %, com lignina total entre 27,5 e 31,7 %. As densidades encontradas ficaram entre 465 e 510 kg/m³. Estes dados mostram que os valores de lignina encontrados no presente estudo com o eucalipto H421 encontram-se dentro da variação normal deste tipo de híbrido, não representando alteração significativa em relação aos dados conhecidos da cultura do eucalipto em ambiente brasileiro.

Tabela V.20. Densidade básica e teor de lignina das amostras de madeiras de eucalipto geneticamente modificado H421 e do controle convencional clone SUZ SP530.

Material	Densidade (kg/m ³)	Lignina %		
		Insolúvel	Solúvel	Total
H421	427,9 ± 23,6	28,4 ± 0,6*	4,0 ± 0,1	32,2 ± 0,6 *
SP530	431,2 ± 38,9	27,5 ± 1,1	4,1 ± 0,2	31,6 ± 1,1

*Diferença significativa entre o evento H421 e o controle convencional SP530 pelo teste t de Student, nível de significância de 5 %.

As análises das fibras foram realizadas em seis amostras por material, eucalipto H421 e controle convencional SP530, na polpa celulósica extraída, depois de coloração com azul de astra. Posteriormente, foram feitas montagens em lâminas de vidro e medições de largura e espessura de parede, em microscópio ótico, com

EM BRANCO

aumento de 40 vezes, e medições de comprimento, em lupa, com aumento de 10 vezes. As imagens microscópicas foram digitalizadas com câmera fotográfica e as dimensões foram mensuradas utilizando-se o programa Image-Pro Plus versão 3.2. Além da utilização de microscópio ótico foram, também, realizadas medições com equipamento automático Galai CIS-100, para determinação de “coarseness” e do número de fibras por grama.

Para simulação de cozimento contínuo em laboratório foi utilizado o Sistema de Simulação de Digestor Contínuo (SSDC) do Laboratório de Celulose e Papel da Universidade Federal de Viçosa. O sistema consiste de um digestor “batch” de seis litros de capacidade, dotado de bomba de circulação, trocador de calor e controlador eletrônico de tempo e temperatura, sendo monitorado por computador. O digestor é acoplado a um conjunto de vasos acumuladores com aquecimento elétrico, permitindo a conexão de todos os vasos, individualmente, com o digestor. Aquecido e pressurizado, o sistema possibilita a utilização de diferentes licores de cozimento nos vasos acumuladores e o deslocamento do licor no digestor pelos licores dos acumuladores, simulando as diferentes zonas de cozimento de um digestor contínuo. Para simulação de um digestor contínuo, foi selecionado um processo de cozimento com vaso de impregnação, baixa temperatura de cozimento e injeções parceladas da carga de álcali. As condições adotadas para simulação de cozimento contínuo foram as seguintes: cavacos = 800 gramas a.s.; sulfidez = 25 %; carga de álcali efetivo = estabelecida experimentalmente para número kappa $18 \pm 0,5$; Zona de Vaporização = 20 minutos com vapor de 1,5 atm.; Zona de Impregnação = 60 % do AE, com L/M de 5/1, por 60 minutos, a 135 °C; Zona de Cozimento: 40 % do AE, L/M de 4/1, por 150 minutos, a 155 °C; Zona de Lavagem = 30 minutos com decréscimo da temperatura de 155° para 95 °C.

Completado o cozimento, os cavacos foram removidos do digestor, por sucção a vácuo, e foram desfibrados em “hidrapulper” laboratorial com 20 litros de capacidade, em consistência de 0,6 %.

A **Tabela V.21** mostra os resultados médios encontrados para a análise morfológica das fibras, com as dimensões determinadas para comprimento, largura, espessura e lumen. Não foram encontradas diferenças significativas entre nenhuma das dimensões pelo teste de Tukey nos níveis de significância de 1 e de 5 %, estando os coeficientes de variação todos abaixo dos 10 %. O comprimento médio da fibra do eucalipto H421 foi de 0,92 mm, sendo de 0,96 mm para o eucalipto convencional SP530. Gomide *et al.* (2005), em trabalho que avaliou dez clones de eucalipto de última geração, encontrou valores variando de 0,95 a 1,07 mm. A espessura de parede encontrada varou de 4,6 a 5,2 μm nesta publicação, intervalo que engloba os valores médios determinados para o eucalipto H421, de 4,27 μm , e para o controle convencional SP530, 4,53 μm .

O eucalipto geneticamente modificado evento H421 apresenta características de madeira muito semelhantes ao seu controle convencional, com parâmetros que se encaixam nos valores médios encontrados para as madeiras e fibras dos clones comercialmente cultivados para a obtenção de celulose e energia no Brasil. Os teores mais altos de lignina solúvel encontrados na comparação com o controle convencional estão dentro da variação aceitável para o processamento industrial de sua madeira.

Tabela V.21. Análise de variância sobre resultados de análise morfológica de fibras (comprimento, diâmetro, lumen, espessura) em árvores individuais do eucalipto H421 e seu controle convencional clone SP530. Árvores com 6,2 anos de idade na avaliação. Experimento de Seleção de Eventos, Fazenda Cabreúva, Angatuba-SP. Resultados do Teste de Tukey.

Análise de variância	Comprimento (mm)	Diâmetro (µm)	Lumen (µm)	Espessura (µm)
GL resíduo	5	5	5	5
F tratamentos	2,18	3,03	0,18	3,19
Média geral	0,94	20,41	11,60	4,40
Desvio-padrão	0,05	0,80	1,13	0,26
DMS (5%)	0,07	1,19	1,67	0,38
CV (%)	4,97	3,93	9,72	5,80
Teste de Tukey a 5%:				
H421	0,92 a	20,00 a	11,46 a	4,27 a
SP530	0,96 a	20,81 a	11,74 a	4,53 a

Nível de significância: **: 1%; *: 5%.

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.

16.2.3. Dormência e germinação de sementes.

A íntegra da descrição dos estudos e resultados obtidos para a avaliação de germinação de sementes pode ser verificada na **Parte VII** deste documento, como parte da resposta ao **Item n. 4** (subitem 4.1).

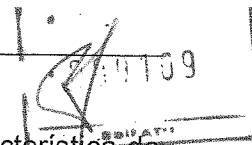
As sementes para avaliação do eucalipto H421 foram colhidas em 2012, na área de Liberação Planejada no Meio Ambiente instalada em 2006 na Fazenda Cabreúva, município de Angatuba - SP, região representativa da produção de eucalipto. As sementes avaliadas foram do eucalipto H421, do eucalipto controle convencional clone SP530 (com *background* genético similar ao eucalipto H421) e de duas referências comerciais de híbridos de eucalipto normalmente multiplicados por sementes.

A comparação estatística entre o eucalipto H421 e o eucalipto controle convencional foi conduzida utilizando-se o teste t de Student. A significância estatística foi acertada para $p \leq 0,05$. Diferenças estatísticas significativas não foram detectadas entre o eucalipto H421 e o controle para as características de sementes medidas no regime de germinação em condições de laboratório. A observação de sementes inviáveis e não germinadas indica que a introdução dos genes para expressão das proteínas Cel1 e NPTII não altera a dormência e germinação das sementes de Eucalipto H421 comparado ao eucalipto controle convencional. Assim, pode-se concluir que não há mudança no potencial do eucalipto H421 como planta daninha em comparação ao eucalipto controle convencional e com base nas características de germinação e dormência avaliadas.

16.2.4. Morfologia e viabilidade do pólen.

A íntegra da descrição dos estudos e resultados obtidos para a avaliação de pólen pode ser verificada na **Parte VII** deste documento, como parte da resposta ao

EM BRANCO



Item n. 4. O objetivo dessa avaliação foi verificar se a introdução da característica de maior crescimento no eucalipto e a expressão das proteínas Cel1 e NPTII alteraram as características do pólen do eucalipto evento H421 comparado ao eucalipto convencional. O material teste foi pólen de eucalipto coletado de plantas de eucalipto H421 com seis anos de idade, bem como de plantas que apresentaram florescimento após um ano de plantio. O material controle foi pólen de eucalipto de plantas convencionais (SUZ SP530) com *background* genético similar ao do eucalipto H421, plantados nas mesmas épocas.

Amostras de pólen de eucalipto H421 e do seu controle convencional foram coletadas de dois experimentos em desenho de blocos ao acaso, instalados sob Liberações Planejadas no Meio Ambiente na Fazenda Cabreúva, em Angatuba - SP em 2007 (processo CTNBio n. 01200.003375/2005-51) e 2011 (processo CTNBio n. 01200.001990/2011-71). As amostras foram compostas de pólen coletado de flores de cinco plantas por parcela, em média.

O grão de pólen do eucalipto geneticamente modificado evento H421 apresentou um comprimento equatorial médio de $20,82 \pm 0,34 \mu\text{m}$ contra $20,73 \pm 0,31 \mu\text{m}$ do clone convencional SP530, com larguras de $20,95 \pm 0,51 \mu\text{m}$ e $20,68 \pm 0,36 \mu\text{m}$, respectivamente. A comparação realizada pelo teste t de Student entre as médias do eucalipto H421 e do controle convencional SP 530 não mostrou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o eucalipto H421 e o eucalipto controle para as duas dimensões avaliadas. Thornhill *et al.* (2012) encontraram comprimentos equatoriais médios de $17,1 \mu\text{m}$ para *E. urophylla* e de $20,6 \mu\text{m}$ para *E. grandis*, com larguras médias de $16,5$ e $19,0 \mu\text{m}$, respectivamente.

A viabilidade dos grãos de pólen, avaliada pelo método do corante de Alexander (1969), em materiais com diferentes idades e plantados em diferentes espaçamentos, também não indicou diferença significativa entre os tratamentos H421 e controle. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas entre a porcentagem de grãos de pólen germinados do evento H421 e do controle convencional SP530 no teste de germinação de tubos polínicos, em diferentes espaçamentos e idades de plantas.

Esses resultados demonstram que a introdução da característica de maior crescimento, com a expressão das proteínas Cel1 e NPTII, não alterou a morfologia, a viabilidade e a germinação dos grãos de pólen do eucalipto H421 em comparação com o eucalipto convencional.

16.3. Potencial do eucalipto H421 como planta invasora

As variedades de eucalipto comerciais atualmente cultivadas, na sua quase totalidade, provenientes da Austrália, são frutos da seleção e melhoramento genético realizados pelo homem, desde o início de sua domesticação, apresentando baixa capacidade biológica de sobrevivência como planta espontânea ou voluntária (não cultivada). Tal evidência pode ser confirmada pela ausência de mecanismos que confirmam dormência às sementes, garantindo sua germinação. Da mesma forma, sementes individualizadas de eucalipto distribuídas nos campos vizinhos a plantios ou nas vias de transporte em locais próximos ao seu cultivo não conseguem sobreviver em função das profundas alterações biológicas realizadas pelo homem através das décadas de seleção e melhoramento. Isto resulta em baixo grau de adaptabilidade e rusticidade às distintas condições a que essa planta pode ser submetida ao longo de

EM BRANCO

seu ciclo de vida, não sendo capaz de sobreviver na maioria das vezes como uma planta espontânea ou população feral devido às modificações genéticas resultantes da seleção e cruzamentos promovidos durante sua evolução e à falta de competitividade em relação a espécies arbóreas pioneiras ou falta de mecanismos de defesa contra insetos que conseguem eliminar plântulas e plantas adultas de eucalipto, como as formigas cortadeiras e as saúvas, por exemplo. O eucalipto não é encontrado se desenvolvendo como uma planta voluntária e/ou daninha em cercas, depressões e laterais de estradas, sendo a grande parte dos indivíduos que se encontram isolados, ou em grupos nestes locais, tendo sido propositalmente plantados e conduzidos em seu período inicial de desenvolvimento. A cultura não possui, portanto, 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).

Eucaliptos são bem adaptados para sobreviver e/ou se restabelecer após incêndios florestais. Uma adaptação particularmente relevante para sua resistência ao fogo, bem como ao seu relativamente baixo potencial invasivo, é o fato das sementes estarem contidas nas árvores em cápsulas protegidas. Alguma semente é liberada logo na sua maturação, mas alguns frutos abrem tardiamente, e irão abrir após incêndios, o que pode resultar numa grande liberação de sementes em consequência da passagem do fogo. As cápsulas, que protegem do fogo, não são geralmente atrativas aos animais dispersores. A semente também tende a ser pequena a sem qualquer aparato aerodinâmico que possa auxiliar na dispersão pelo vento. Assim, a área de dispersão das sementes está relacionada à altura da árvore, diâmetro da copa, velocidade do vento, massa e velocidade final da semente, sendo estimada em cerca de 39 m para árvores de *E. marginata* de 30 m de altura (Booth, 2012).

Embora a semente do eucalipto possa sobreviver a invernos leves ou em áreas que sofreram incêndios e germinar no ano seguinte, esta não é capaz de persistir como planta daninha. As eventuais plantas voluntárias que ocorrem em áreas florestais são facilmente controladas por meio das práticas utilizadas regularmente, incluindo capinas e utilização de herbicidas de largo espectro, são eliminadas por formigas e outros insetos ou são suplantadas e sombreadas por espécies arbóreas pioneiras, de crescimento inicial mais vigoroso. A regeneração natural a partir de crescimento vegetativo de brotações de tocos remanescentes de cultivos ocorre na maioria das espécies de eucalipto plantadas comercialmente. Sua condução é uma opção para a regeneração de árvores para nova produção sem realização de novo plantio, bem como sua dessecação é facilmente realizada com o uso de herbicidas de amplo espectro.

Avaliação realizada em 18 áreas de regiões de tradição florestal no Brasil, para verificar o risco de invasão de sistemas naturais por espécies de eucalipto a partir de talhões de cultivo, levantou que em 90 % das parcelas analisadas fora das áreas de cultivo não ocorrem plantas ou plântulas de eucalipto. No entanto, plântulas de eucalipto foram observadas em 29 % das parcelas dentro dos talhões comerciais (densidade média de 37 plântulas por hectare) e em 40 % das parcelas localizadas nos carregadores (157 plântulas por hectare, em média), mas não foram observadas plantas adultas oriundas da regeneração natural (**Tabela V.22**). Com este levantamento foi verificado que plântulas das espécies de eucalipto estudadas raramente são encontradas fora dos talhões de cultivo. Dentro dos talhões ou nos

BLA BRANCO

carreadores as espécies podem germinar, mas aparentemente as plântulas não se estabelecem. Considera-se baixo, portanto, o potencial de invasão pelo eucalipto por meio das sementes produzidas nos plantios comerciais (Silva *et al.*, 2011).

Tabela V.22. Densidade mínima, máxima e média de plântulas de eucalipto em regeneração natural (indivíduos por hectare) nas diferentes condições estudadas.

Área	Mínimo	Maximo	Media	
Talhão	0	410	37	B
Carreador	0	1800	157	A
Veg. vizinha 10 m	0	90	3	C
Veg. vizinha 50 m	0	30	0	C
Veg. vizinha 100 m	0	0	0	C
Veg. vizinha 200 m	0	0	0	C

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

Em estudo comparativo conduzido em duas áreas sob Liberação Planejada no Meio Ambiente, em Angatuba – SP e em Caravelas – BA, com o eucalipto H421, o eucalipto controle convencional e duas variedades comerciais multiplicadas por sementes, a germinação e a capacidade de estabelecimento de plantas voluntárias em parcelas semeadas com eucalipto foram avaliadas. Alterações nestas características poderiam indicar um potencial impacto na capacidade do evento se apresentar como uma planta daninha e, em particular, apresentar potencial de se transformar em uma planta invasora.

A instalação do teste obedeceu ao plano estabelecido na Liberação Planejada no Meio Ambiente aprovada pela CTNBio, processo nº 01200.003279/2012-31. Na primeira tentativa de instalação do experimento, as sementes foram depositadas sobre o solo limpo, levemente escarificado e previamente molhado, sendo cobertas com leve camada de terra peneirada. Devido à total ausência de germinação das sementes nesta primeira instalação do experimento na Fazenda Cabreúva, em Angatuba - SP, quando as sementes foram somente dispostas sobre o solo limpo previamente molhado, foi necessário realizar uma segunda instalação, buscando-se a obtenção de dados para comparação. Na reinstalação do experimento, as seguintes adequações foram promovidas: o solo foi afogado com o auxílio de uma enxada (camada de cerca de 5,0 cm), rastelado para nivelamento e padronização do terreno, as sementes foram depositadas nas parcelas e, então, uma fina camada de vermiculita foi colocada sobre as sementes, objetivando reter a umidade e não obstar a germinação das sementes e emergência das plântulas. Uma cobertura de tela, “sombrite” 50 %, foi colocada sobre as parcelas para diminuir a incidência do sol direto e de chuva. A área do experimento passou a ser irrigada diariamente com o uso de um pulverizador costal com água, durante 30 dias, quando então a irrigação foi suspensa e a cobertura de tela retirada.

O material remanescente foi descartado, seguindo as normas estabelecidas pela CTNBio. Não foi registrado qualquer fato relevante do ponto de vista de biossegurança durante o transporte e semeadura. As quantidades de sementes distribuídas em cada parcela de cada tratamento foram determinadas em 100 sementes viáveis, com o

EM BRANCO

número total estipulado de acordo com a % de germinação determinada para cada material, que foram os seguintes: eucalipto H421 (GM) - 119 sementes; clone convencional SP530 (WT) - 122 sementes; variedade referência comercial M25D2 (RC I) - 147 sementes e variedade referência comercial M26D2 (RC II) - 135 sementes. Os valores encontrados da germinação de sementes dos materiais, em estudo conduzido *in vitro*, antes da instalação do experimento a campo, podem ser verificados na **Tabela V.23** abaixo. Não houve diferença significativa entre os valores encontrados para a % de germinação de sementes do eucalipto geneticamente modificado evento H421 e do eucalipto controle convencional clone SUZ SP530.

Tabela V.23. Valores de germinação das sementes de eucalipto utilizadas no estudo de estabelecimento de plantas voluntárias, 2012.

Material	Quantidade inicial de sementes	% Germinação	DP
H421	100	84,3	1,2
SP530	100	82,0	8,2
M25D2	100	68,0	10,4
M26D2	100	74,0	7,5

Não foram encontradas, também, diferenças significativas na capacidade de germinação e estabelecimento de plântulas a campo, em duas áreas, entre o eucalipto geneticamente modificado evento H421 e o seu controle convencional clone SUZ SP530. As curvas determinadas pelo número médio de sementes germinadas e plântulas estabelecidas para cada material em cada época de observação são apresentadas na **Figura V.34**, abaixo. É possível observar que a sobrevivência dos materiais em campo vai diminuindo, de maneira semelhante para todos os materiais, com curvas paralelas, conforme o avanço do tempo. Na Bahia, plântulas e plantas não foram mais observadas depois de cessada a irrigação. Em São Paulo, algumas plantas ainda eram observadas no momento de finalização do estudo, embora a curva mostrasse que a sobrevivência vinha diminuindo ao longo do tempo, devido à morte das plantas e plântulas devido à competição com plantas invasoras espontâneas, ataque de formigas ou seca. Em nenhuma das áreas houve diferença significativa entre o número de plântulas ou plantas nas parcelas do evento H421 e do clone convencional SP530. Os resultados desse estudo permitem a conclusão de que a introdução da característica de maior crescimento não alterou as características avaliadas, em comparação com o eucalipto controle. Assim, os resultados suportam a conclusão de que não houve aumento do potencial de invasão do eucalipto H421 comparado ao eucalipto controle convencional. O monitoramento extensivo pós-colheita das parcelas dos experimentos de campo plantados com o eucalipto H421 e com o eucalipto controle SP530 não revelou qualquer diferença em sobrevivência ou persistência em relação a outro eucalipto. Esses dados sugerem que o eucalipto H421 não tem maior potencial que o eucalipto convencional de se tornar uma planta voluntária ou invasora.

EM BRANCO

0894113
FuturaGene

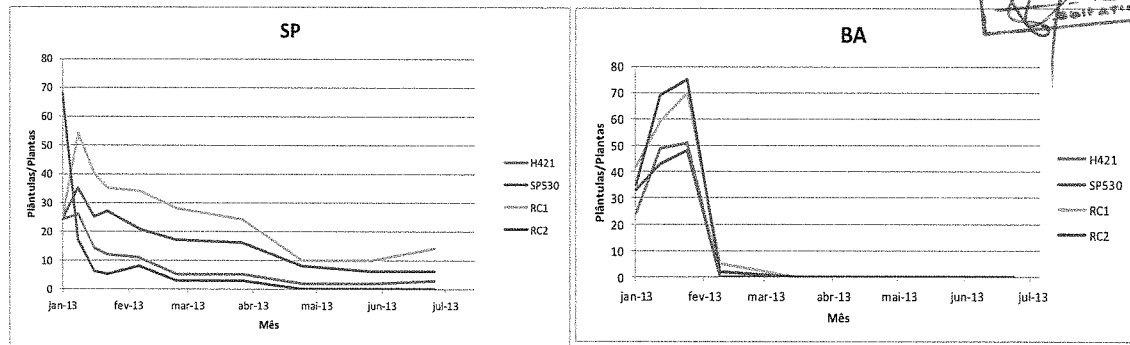


Figura V.34. Gráficos com germinação e estabelecimento de plântulas do eucalipto evento H421, eucalipto controle convencional SP530 e referências comerciais (RC1, RC2) a campo, a partir de 100 sementes viáveis distribuídas em parcelas sob Liberação Planejada no Meio Ambiente, em Angatuba (SP) e Caravelas (BA), 2013.

16.2.5. Interação das plantas com patógenos

Observações da incidência e severidade do ataque de doenças foram realizadas nos campos experimentais aos seis meses do plantio. Para a compilação dos resultados de incidência e severidade de ataque de ferrugem do eucalipto, causada pelo patógeno *Puccinia psidii*, a atribuição de notas seguiu as escalas indicadas nas Figuras V.35 e V.36.

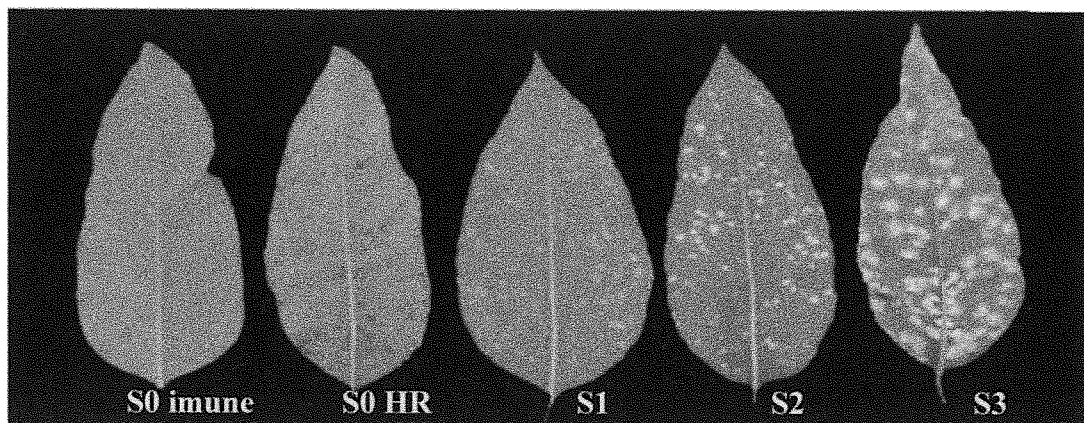


Figura V.35. Escala de notas para a avaliação da resistência a ferrugem do eucalipto (*Eucalyptus sp.*), com quatro classes de severidade: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade do tipo "fleck" ou necrótico; S1 = pústulas < 0,8 mm de diâmetro; S2 = pústulas de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro; e S3 = pústulas > 1,6 mm de diâmetro (Junghans *et al.*, 2003).

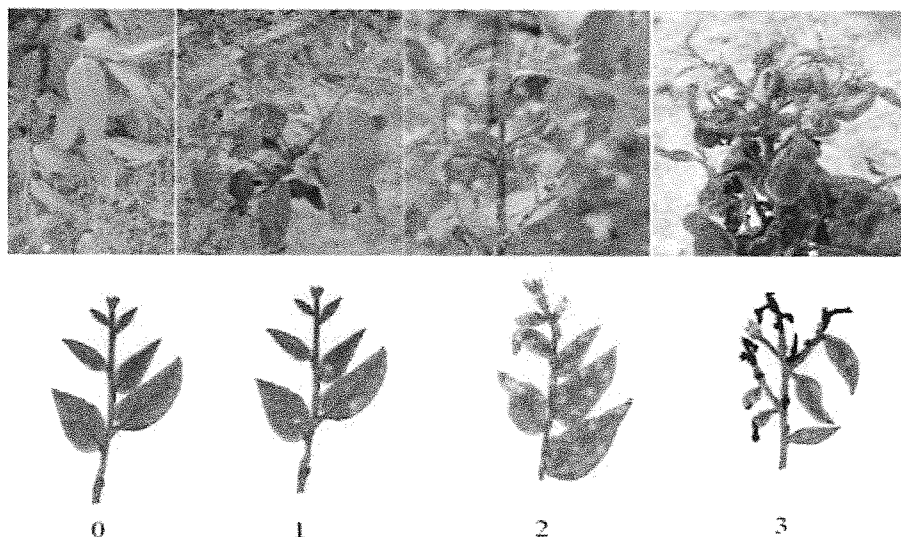


Figura V.36. Escala de notas para avaliação da severidade da ferrugem no campo, desenvolvida por Takahashi (2002) adaptada por Daniela A. Neves e Daniel D. Rosa (Alfenas *et al.*, 2009).

No experimento instalado em novembro de 2011 na Fazenda Cabreúva, município de Angatuba, em São Paulo, a avaliação realizada em julho de 2012 não mostrou diferença em relação à incidência e severidade entre o eucalipto geneticamente modificado evento H421 e o clone controle convencional SP530, tanto no espaçamento menor (3,0 x 1,0 m, **Figura V.37**) quanto no maior (3,0 x 2,0 m, **Figura V.38**). A totalidade das plantas destes tratamentos se apresentava sem sintoma algum de ataque (S0) de ferrugem, sendo apontada somente a presença pequena de falhas ou de plantas mortas. Os tratamentos de referência, com variedades convencionais comerciais, por sua vez, chegaram a apresentar a maioria das plantas observadas, entre 57,3 e 88,3 %, com o índice mais alto de severidade de ataque de ferrugem (S3).

EM BRANCO

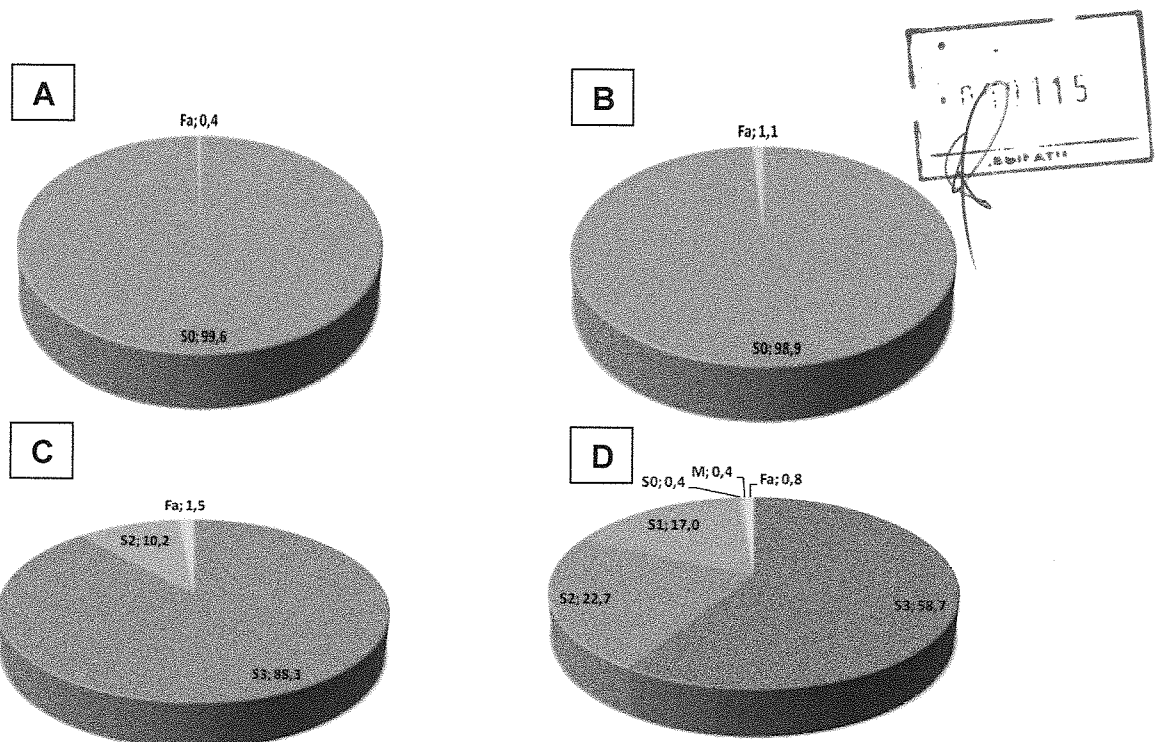


Figura V.37. Porcentagem de plantas (%) doentes do evento H421 (A), do clone controle convencional SP530 (B) e das referências comerciais convencionais (C e D) no espaçamento 3,0 x 1,0 m, classificadas em experimento de campo na Fazenda Cabreúva, em Angatuba – SP, quanto à severidade a ferrugem, segundo escala de notas proposta por Junghans *et al.*, 2003. Fa = falhas nas plantas avaliadas; M = plantas mortas.

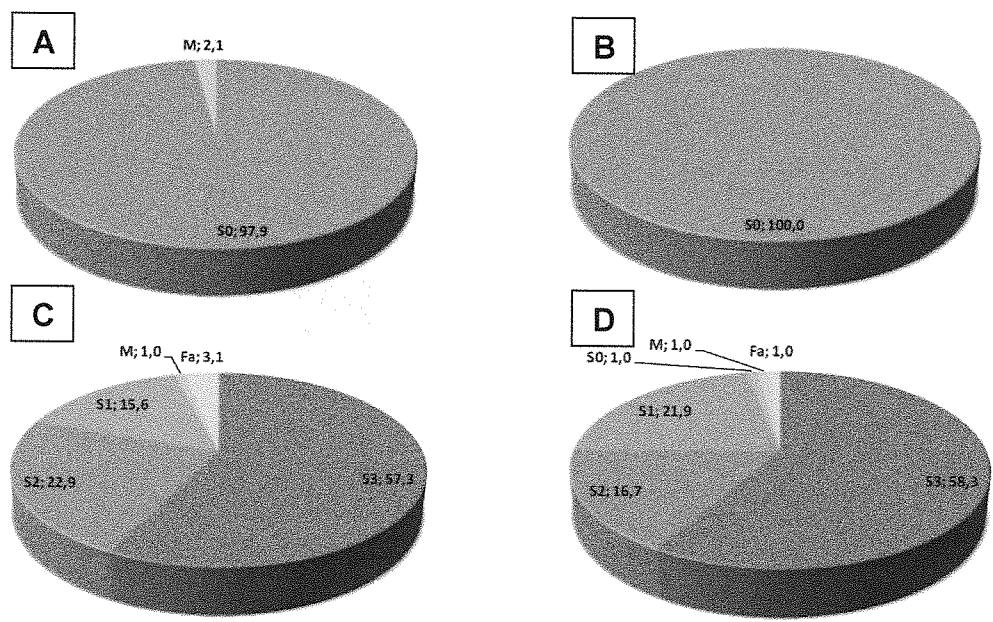


Figura V.38. Porcentagem de plantas (%) doentes do evento H421 (A), do clone controle convencional SP530 (B) e das referências comerciais convencionais (C e D) no espaçamento 3,0 x 2,0 m, classificadas no campo da Fazenda Cabreúva, em Angatuba – SP quanto à severidade a ferrugem, segundo escala de notas proposta por Junghans *et al.*, 2003. Fa = falhas nas plantas avaliadas; M = plantas mortas.

EM BRANCO

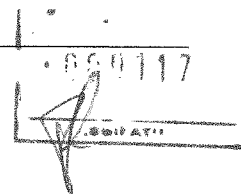
Foram registradas ainda as observações em relação às anormalidades encontradas nas parcelas dos tratamentos nos experimentos da Fazenda Cabreúva, em Angatuba – SP e da Fazenda Chave-de-ouro, em Caravelas – BA, nos plantios entre os 8 e 9 meses de idade, não sendo detectadas diferenças significativas entre os tratamentos 1 e 2 (evento H421 e controle SP530, respectivamente) e entre os tratamentos 5 e 6 (evento H421 e controle SP530, respectivamente), conforme indicado abaixo nas **Tabelas V.24 e V.25**.

Tabela V.24. Observação de plantas em campo da Fazenda Cabreúva, em Angatuba - SP, Julho de 2012 (cerca de 8 meses após o plantio).

Tratamento	Nº de falhas	Nº de plantas bifurcadas acima	Nº de plantas bifurcadas abaixo	Nº de plantas pouco tortas	Nº de plantas tortas muito tortas	Nº de plantas mortas
1	1			264		
2	3	1		263		
3	4	1		261	2	
4	2		3	259	2	1
5			1	95		2
6				96		
7	3			96		1
8	1	2	1	93		1

Tabela V.25. Observação de plantas em campo da Fazenda Chave-de-ouro, em Caravelas – BA, Agosto de 2012 (cerca de 9 meses após o plantio).

Tratamento	Nº de falhas	Nº de plantas bifurcadas acima	Nº de plantas bifurcadas abaixo	Nº de plantas mortas	Nº de plantas atacadas por inseto		
					"Grilo"	Lagarta	Cupim
1	1	0	0	0	11	0	0
2	1	0	3	1	23	0	0
3	1	0	1	0	26	0	0
4	2	1	3	1	6	23	1
5	0	1	0	0	1	0	0
6	0	0	1	0	4	0	0
7	0	0	1	0	1	0	0
8	1	1	3	0	3	0	0



16.2.6. Outros parâmetros fenotípicos e composicionais

Lucas *et al.* (2013) apresentam os resultados das análises dos óleos essenciais do eucalipto evento H421, como parte do projeto "Criação do CDA *Eucalyptus*: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para a Biossegurança Relativa a Plantas GM de Eucalipto", da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento (MAPA) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), coordenado pelo Prof. Giancarlo Pasquali, cujo relatório encaminhado ao CNPq, com os principais resultados, encontra-se no **Anexo I** deste documento.

Óleos essenciais ou voláteis são componentes-chave de muitos órgãos vegetais responsáveis por sinais ecológicos, além de outras funções fisiológicas (Burt, 2004). Óleos essenciais são uma mistura de fenilpropanóides e terpenos (Bizzo *et al.*, 2009). Estes são frequentemente obtidos de vários materiais vegetais, por diferentes métodos. As vantagens e desvantagens de alguns métodos como a destilação por vapor, a hidrodestilação, extração por solventes, destilação-extração simultâneas, extração supercrítica por dióxido de carbono e uso de forno de microondas têm sido discutidas largamente (Golmakani e Rezaei, 2008; Richter e Schellenberg, 2007). Entretanto, destilação a vapor é a técnica mais comumente utilizada para a extração de óleos essenciais, apresentando-se como método simples e barato (Cassel e Vargas, 2006). Os óleos essenciais das árvores de eucalipto são conhecidos por sua atividade inseticida e fungicida (Batish *et al.*, 2008). A atividade inseticida dos óleos de eucalipto pode ser atribuída à presença de terpenos como benzaldeído, α -pineno, *p*-cymeno e 1,8-cineol (Lee, 2001; Lucia *et al.*, 2009). Efeitos alelopáticos têm sido também associados com a presença de α -pineno, limoneno, 1,8-cineol e citronelal em óleos essenciais presentes nas folhas de eucalipto (Batish, 2008; Ferreira, 2000; Liu *et al.*, 2007). Lucas *et al.* (2013) realizaram análise da composição dos óleos essenciais extraídos de folhas de eucaliptos, para avaliar os possíveis impactos das árvores geneticamente modificadas nesta característica. Desta forma, o objetivo do trabalho foi o de comparar os perfis cromatográficos de óleos essenciais de folhas de árvores geneticamente modificadas e convencionais híbridas de *E. grandis* x *E. urophylla*, extraídos por destilação a vapor. A comparação foi submetida a um método estatístico baseado em Análise de Componentes Principais - PCA (Jackson, 2003; Johnson e Wichern, 2007).

A extração de óleos essenciais foi conduzida por destilação a vapor usando-se folhas descongeladas de cada amostra (55 g da primeira coleta e 200 g da segunda) sem qualquer pré-processamento. Extrações foram realizadas em duplicata para cada amostra. Embora as vias que levam aos polissacarídeos e aos fenilpropanóides e terpenos não estejam ligadas ao mesmo conjunto de genes e enzimas, a super ou nova expressão de genes relacionados ao metabolismo da celulose pode afetar o metabolismo de outros metabólitos relevantes, como os óleos essenciais.

Inicialmente foi medida a produção nas folhas dos híbridos. A produção média de óleos essenciais em folhas variou de 0,36 a 0,61 % m/m. O rendimento de óleos essenciais foi estatisticamente equivalente em todas as amostras. No entanto, neste estudo, o rendimento de óleos essenciais obtidos foi menor que os valores relatados para as espécies parentais. Rendimentos médios de 0,7 % a 4,5 % m/m foram

LIBRARY

reportados para *E. grandis* (Ogunwande *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2008). *Em-E* *urophylla*, o rendimento de óleos essenciais variou de 0,53 % a 1,1 % m/m (Cimanga *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2008).

Os níveis de óleos essenciais em folhas foram medidos e seus componentes identificados por Cromatografia Gasosa - GC/FID. Os dados gerados e submetidos a análise estatística apropriada permitem concluir que (a) o rendimento de óleos essenciais foi similar entre os eucaliptos GM e convencional; e (b) não existe diferença significativa nos perfis de óleos essenciais entre plantas GM e convencionais, tanto quantitativa como qualitativamente.

16.7. Conclusões sobre as avaliações fenotípicas e das interações ecológicas.

Um grupo grande de dados e informações foram usados para avaliar se a expressão das proteínas Cel1 e NPTII no eucalipto evento H421 alterou o potencial impacto desse eucalipto geneticamente modificado quando comparado ao eucalipto controle convencional. A avaliação foi baseada na caracterização fenotípica e nas interações ecológicas, além da caracterização da composição, apresentada neste documento (**Parte V - Item n. 16**). A comparação se deu entre o eucalipto H421, o eucalipto controle convencional clone SP530 e contou com referências comerciais convencionais diferentes, adaptadas a cada região representativa de produção da cultura. Dados foram coletados para parâmetros de dormência/germinação, características de pólen, características fenotípicas e de manejo durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas, com observações para interação planta-inseto, planta-doença e planta-estresse abiótico, além de comparações com resultados das análises de composição centesimal.

Os resultados das avaliações fenotípicas indicam que o eucalipto geneticamente modificado evento H421 não possui características que possam conferir um risco de impacto significativo ao ambiente ou da planta se tornar invasora (ou daninha) quando comparada ao eucalipto convencional clone SP530. Dados de interações ecológicas também indicam que o eucalipto H421 não confere nenhuma suscetibilidade ou tolerância maior a insetos ou doenças e estresses abióticos. Os dados de composição (subitem **16.1** da resposta ao mesmo **Item n. 16**) também suportam a conclusão sobre a equivalência composicional do eucalipto evento H421 e do eucalipto convencional SP530. Tomados em conjunto, esses dados mostram que o eucalipto H421 não impõe risco de impacto ecológico significativamente alterado comparado com o eucalipto convencional.

EM BRANCO

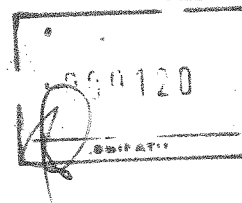


PARTE VI - AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA E ANIMAL

ANEXO III da Resolução Normativa N° 5, 12/03/2008

IN BRANCO

AValiação DE RISCO À SAÚDE HUMANA E ANIMAL



(A) Organismos consumidos como alimento.

Informar:

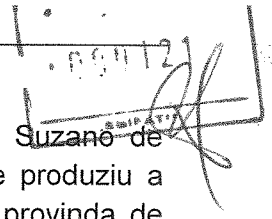
- 1. O histórico de uso na alimentação, no Brasil e em outros países do organismo parental ou doador, indicando o nível de consumo, o processamento anterior ao consumo e as espécies animais que se alimentam destes organismos.**

Eucalipto não apresenta histórico de uso na alimentação no Brasil ou em outros países, na forma direta ou de maneira processada, não sendo consumido por humanos ou animais que sirvam de alimento ao homem ou a outros animais. A espécie foi introduzida no Brasil no início do século XX para uso na confecção de dormentes de madeira para assentamento de trilhos das linhas férreas e como fonte de energia na alimentação das locomotivas a vapor, para a movimentação dos trens. Hoje, cerca de 40 % da área plantada de eucalipto ainda tem o objetivo de uso de geração de energia, principalmente para a indústria de mineração e siderurgia. Aproximadamente 35 % da área plantada atende à demanda para produção de celulose, sendo o restante direcionado à elaboração de produtos de serraria, como compensados, painéis e laminados ou para uso na construção civil.

Eucalipto - Histórico do desenvolvimento para celulose

A Companhia Suzano de Papel e Celulose, empresa brasileira com atuação mundial, está intimamente ligada ao desenvolvimento do uso de eucalipto para a produção de celulose, desempenhando papel fundamental na pesquisa e adoção industrial deste como matéria-prima. A Suzano Papel e Celulose tem sua origem ligada à empresa Leon Feffer e Cia. (fundada em 1924), que se dedicava à revenda de papéis nacionais e importados. Com a evolução de seus negócios, montou uma gráfica, passando concomitantemente a fabricar sacos de papel, envelopes e cadernos escolares. Com a aquisição da primeira máquina de papel no final da década de 30, foi iniciada a produção própria de papel. O aumento do consumo de matéria-prima, na época totalmente importada dos Estados Unidos, Canadá, Suécia e Finlândia, levou os consumidores nacionais a enfrentarem dificuldades na sua obtenção. Em função disto, a Indústria de papel Leon Feffer decidiu produzir sua própria pasta celulósica, iniciando as pesquisas para obtenção a partir do eucalipto, cultivo que já vinha sendo implementado no Estado de São Paulo para uso como fonte energética e de materiais das ferrovias, bem como fonte auxiliar durante a 2ª Guerra Mundial. As pesquisas, desenvolvidas por técnicos da Leon Feffer em colaboração com pesquisadores da Universidade da Flórida, foram coroadas de êxito em 1954, com o aperfeiçoamento do processo de fabricação do papel e cartão a partir desta pasta celulósica proveniente exclusivamente do eucalipto. A base florestal, antes depositada na exploração de matas nativas de araucária e cultivo de pinheiros, passava a se expandir neste momento para as áreas de eucalipto, localizadas em regiões mais ao centro e norte do que as áreas de coníferas da região Sul. Em 1955 foi adquirida a Indústria de papel Euclides Damiani, em Suzano - SP, para a implantação de uma unidade-piloto de produção de celulose de eucalipto. No ano

EN BRANCO



seguinte esta indústria tem sua razão social alterada para Companhia Suzano de Papel e Celulose. Em 1962 a Companhia Suzano de papel e Celulose produziu a primeira folha de papel branco com 100 % de celulose de fibra curta, provinda de eucalipto. Isto representa um verdadeiro marco na indústria de papel do Brasil e do mundo, pois revolucionou todo o tradicional método até então utilizado e abriu espaço para um novo e inexplorado mercado. Desde então, utiliza-se exclusivamente o eucalipto como fonte de celulose para a fabricação de papel na Companhia. Acompanhando este desenvolvimento, a empresa investiu ainda em um sistema pioneiro de tratamento de efluentes líquidos e na instalação de precipitadores eletrostáticos nas caldeiras de recuperação, demonstrando, desde o início, um cuidado especial com os impactos da sua atividade sobre o ambiente e uma grande capacidade de inovação.

Desde o início das pesquisas voltadas a produção de celulose a partir do eucalipto a Suzano já se preocupava com a importância de também dominar as técnicas de cultivo desta espécie.

Na década de 1960/1970 a produtividade média do eucalipto no estado de SP não passava de 20 m³. Já na década seguinte a Suzano iniciou investimentos para aumentar esta produtividade. Plantios próprios, maiores cuidados com a procedência das sementes, com a qualidade das mudas e início de uma silvicultura mais tecnificada foram adotados naquele momento.

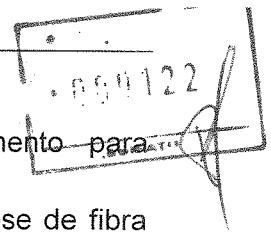
A década de 80 marca o início dos plantios com sementes produzidas em pomares de sementes, a modernização dos viveiros, com a adoção de tubetes e substratos mais apropriados. Também se inicia neste momento o uso da técnica do cultivo mínimo, em que a Suzano foi também pioneira, que revolucionou a silvicultura, tornando-a mais sustentável e altamente conservacionista em relação aos aspectos de solo. O cultivo mínimo, que se caracteriza pela minimização da movimentação de solo, sem uso de operações de revolvimento e desintegração dos torrões e agregados, diminui grandemente a erosão nas áreas de cultivo.

Nos anos seguintes o melhoramento genético avança, estabelecendo pomares de sementes de segunda e terceira gerações, iniciam-se os plantios comerciais de monoprogenies e de clones. O cultivo mínimo se aperfeiçoa com o desenvolvimento de novos equipamentos e adequações na fertilização. A empresa inicia os primeiros plantios experimentais de clones poliploides.

Nos anos 2000 acontece a consolidação da clonagem do eucalipto e um grande salto na produtividade é observado, as florestas atingem produtividades superiores a 40 m³. A Suzano aumenta seus investimentos em biotecnologia e desenvolve internamente uma tecnologia de transformação genética para a espécie. Neste período parcerias com empresas e instituições internacionais dão grande avanço e proporcionam o plantio dos primeiros ensaios com eucaliptos GM.

Nos últimos dez anos, a empresa aperfeiçoou a tecnologia de produção de mudas clonais, adotando e desenvolvendo os minijardins e o enraizamento de ápices caulinares (microestacas). Na silvicultura, ocorreu a adoção sistemática de unidades de manejo, com técnicas de preparo de solo e fertilização específicas para cada microrregião, assim como indicação de clones mais adaptados. Ocorre o atingimento de produtividades recordes acima de 55 m³ em vastas regiões do Estado de SP. A obtenção de florestas com alto grau de homogeneidade entre suas plantas permitiu a uniformização de tratamentos nos talhões e garantiu a padronização da época de

EM BRANCO



colheita, otimizando os recursos logísticos e facilitando o planejamento para a alimentação das plantas industriais.

Como evolução desse processo de inovação na produção de celulose de fibra curta, a Suzano passou a desenvolver pesquisas na promissora área que envolve as técnicas de DNA recombinante, já no início do século XXI, inicialmente por meio de associação com empresas e institutos de pesquisa públicos, fornecendo materiais de base para as primeiras tentativas de transformação de plantas de eucalipto. A FuturaGene, nesta época, já desenvolvia trabalhos nesta área, agrupando outras empresas da área florestal interessadas em aplicar a biotecnologia para obter maior produtividade e melhoria de características industriais da madeira.

A obtenção do eucalipto evento H421 em 2003, a partir do clone convencional SP530 da Suzano Papel e Celulose, com a confirmação de suas características de maior crescimento em testes de laboratório e, posteriormente nos plantios de campo realizados sob liberação planejada no meio ambiente aprovadas pela CTNBio a partir de 2006, levaram ao processo de aquisição da FuturaGene pela empresa, concretizado no ano de 2010. Desde então, esforços vêm sendo direcionados para a ampliação da estrutura de laboratórios para transformação, multiplicação de materiais e análises moleculares na sua sede em Itapetininga – SP, onde já se encontrava instalado o Centro de Tecnologia Florestal da Suzano, hoje sede da FuturaGene Brasil.

Com sua constante visão de futuro, a empresa vem trabalhando para desenvolver tecnologias mais adequadas à região Nordeste, onde vem ampliando sua atuação, enfrentando diferentes desafios relacionados aos estresses ambientais característicos destes novos campos. O uso intensivo do melhoramento e da biotecnologia vêm se apresentando como uma importante ferramenta para aumentar a produtividade da produção florestal, influenciando a competitividade do setor em escala mundial.

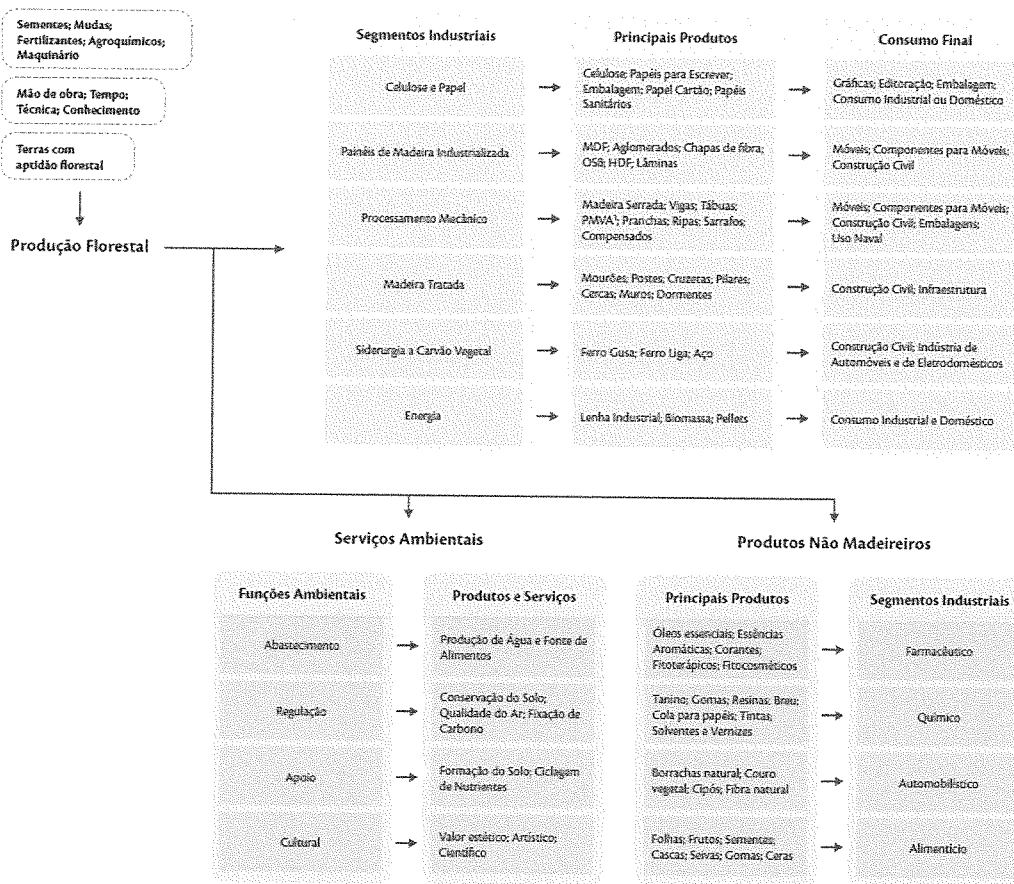
Usos da madeira

O eucalipto foi introduzido no Brasil no início do século XX, inicialmente para uso na produção de lenha e dormentes para as empresas ferroviárias, notadamente a Companhia Paulista de Estradas de Ferro.

Hoje seu uso está mais disseminado, tendo aplicação em diferentes áreas e processos domésticos e industriais como: lenha, produção de carvão, biorredutor, celulose e papel, fabricação chapas de fibras e aglomerados, laminados, compensados, madeira tratada, madeira serrada, cavacos de madeira, pellets e briquetes, biocombustíveis.

O uso energético continua representando o maior consumo de madeira para um fim específico no país, atingindo 61 % do volume total (Brito, 2007). Menos de 25 % da área total plantada com eucalipto no Brasil destina-se à produção de celulose. Os aproximados 15 % restantes são utilizados para os outros usos indicados da madeira, como pode ser observado na **Figura VI.1**.

123
 [Handwritten signature]



Fonte: Adaptado de VIEIRA, L. A. – Sesor Florestal em Minas Gerais: caracterização e dimensionamento. Belo Horizonte – Universidade Federal de Minas Gerais, 2004 e FSC 2011.
 * PMVA (Produtos de Maior Valor Agregado) – portas, janelas, molduras, pisos, dormentes, outros.

Figura VI.1. Modelo simplificado da cadeia produtiva do setor florestal (ABRAF, 2013).

Óleos essenciais

Os óleos essenciais são classificados em três grupos de acordo com sua aplicação, que são: industriais, para perfumaria ou para uso medicinal. Em torno de 600 espécies de eucalipto já foram descritas, das quais 20 são citadas para uso comercial. Todas as espécies de eucalipto são ricas em compostos monoterpênicos, sendo as espécies com fins medicinais ricas em cineol (mínimo de 70%), enquanto aquelas de aplicação industrial destacam-se pelo teor de felandreno e piperitona e as de uso na perfumaria são ricas em citronelal, citral ou acetato de geranila. No Brasil, a principal espécie produtora de óleo medicinal é a *Eucalyptus globulus*, enquanto que a espécie produtora de óleo para a perfumaria é a *E. citriodora*, rica em citronelal, ao lado de *E. staigeriana*, rica em citral. Não há produção destacada no país em espécies produtoras de óleos para fins industriais.

As espécies de eucalipto introduzidas no Brasil no início do século XX são específicos para fins de aproveitamento da madeira, sendo muito utilizadas para a indústria de celulose, serraria, postes, mourões de cercas e produção de carvão vegetal. Na produção de óleos essenciais - OE, para cada 1.000 kg de massa foliar, são obtidos cerca de 10 a 16 kg de óleo (1,0 a 1,6 % de rendimento) e entre 65 a 85 %

EM BRANCO

1.599.124
 SP/AT

de citronelal. *E. globulus* fornece OE em rendimento superior (1,5 a 5,5%) dependendo da subespécie, enquanto que *E. staigeriana* apresenta rendimento médio de 1,4 %. A **Tabela VI.1** apresenta o componente principal de óleos essenciais presentes em diferentes espécies de eucaliptos e seu rendimento na extração.

Tabela VI.1. Componente principal e rendimento de extração de óleos essenciais por espécie de eucalipto.

Espécies	Componente Principal		Rendimento
	Nome	Teor (%)	(%)*
Óleos medicinais			
<i>E. camaldulensis</i>	Cineol	80-90	0,3-2,8
<i>E. cneorifolia</i>	Cineol	40-90	2,0
<i>E. dives</i> (var. <i>cineol</i>)	Cineol	60-75	3,0-6,0
<i>E. dumosa</i>	Cineol	33-70	1,0-2,0
<i>E. elaeophara</i>	Cineol	60-80	1,5-2,5
<i>E. globulus</i>	Cineol	60-85	0,7-2,4
<i>E. leucoxyton</i>	Cineol	65-75	0,8-2,5
<i>E. oleosa</i>	Cineol	45-52	1,0-2,1
<i>E. polybractea</i>	Cineol	60-93	0,7-5,0
<i>E. radiata</i> subesp. <i>radiata</i> (var. <i>cineol</i>)	Cineol	65-75	2,5-3,5
<i>E. sideroxyton</i>	Cineol	60-75	0,5-2,5
<i>E. smithii</i>	Cineol	70-80	1,0-2,2
<i>E. tereticornis</i>	Cineol	45	0,9-1,0
<i>E. viridis</i>	Cineol	70-80	1,0-1,5
Óleos industriais			
<i>E. dives</i> (var. <i>felandreno</i>)	Felandreno	60-80	1,5-5,0
<i>E. dives</i> (var. <i>piperitona</i>)	Piperitona	40-56	3,0-6,5
<i>E. elata</i> (var. <i>piperitona</i>)	Piperitona	40-55	2,5-5,0
<i>E. radiata</i> subesp. <i>radiata</i> (var. <i>felandreno</i>)	Felandreno	35-40	3,0-4,5
Óleos para perfumaria			
<i>E. citriodora</i> (var. <i>citronelaf</i>)	Citronelal	65-80	0,5-2,0
<i>E. macarthurii</i>	Ac. de geraniil	60-70	0,2-1,0
<i>E. staigeriana</i>	Citral (a+b)	16-40	1,2-1,5

* Rendimento base de peso de folha fresca.

Fonte: Lassak (1988) e Doran (1991)

As espécies utilizadas na produção de madeira para processamento na indústria de celulose e papel não apresentam aptidão para extração destes óleos, uma vez que são selecionadas para crescimento e produtividade do lenho. O eucalipto geneticamente modificado evento H421, que tem como base de transformação o clone convencional SP530, é um híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*, que, da mesma forma, não apresenta características qualitativas ou quantitativas de interesse para extração de óleos essenciais, sendo seu uso completamente adaptado e direcionado para a produção de madeira, para uso em obtenção de energia ou produção de celulose.

Organismo doador

Arabidopsis thaliana (Viridiplantae, Spermatophyta; Brassicaceae)

EM BRANCO

Nativa da Europa, Ásia e Nordeste da África, organismo doador do gene *cel1*, não é planta que tenha evidências de ser patogênica ou tóxica para humanos ou animais e não é comumente alergênica, não justificando a realização de testes analíticos ou toxicológicos. Com pouca expressão para aplicação na agricultura e sem histórico de uso na alimentação humana ou animal, a espécie se tornou planta modelo para estudos de genética e desenvolvimento vegetal ao ter seu genoma inteiramente sequenciado, com uma sucessão significativa de trabalhos voltados para decodificar e estabelecer a relação de função de seus mais de 27.000 genes encontrados. Por outro lado, *Arabidopsis* é um gênero da mesma família da mostarda (Brassicaceae), que inclui espécies cultivadas e consumidas na alimentação humana como a couve, o brócoli e o rabanete, alimentos com histórico de uso seguro. A proteína Cel1 é encontrada, em formas muito similares e com grande identidade, em grande número de alimentos consumidos de forma crua ou com diferentes processamentos, por humanos e animais.

Adicionalmente, algumas hidrolases, como as β -glucanases de *Aspergillus niger* e de *Bacillus subtilis*, têm sido utilizadas há tempos no processamento alimentar e são incluídas em alimentos; efeitos negativos não têm sido documentados (Pariza and Foster, 1983, in Franck-Oberaspach e Keller, 1997).

Proteína 1,4- β -endoglucanase (Cel1)

Utilizando ferramentas de análise de bioinformática, foi realizada avaliação com o objetivo de verificar a presença de produtos da construção presente no eucalipto geneticamente modificado evento H421 em alimentos, especialmente naqueles que são consumidos crus.

A análise foi realizada para ambos os genes presentes na construção do evento H421: o gene *cel1* de *Arabidopsis thaliana* e o gene marcador de seleção *nptII*. Esta análise teve como base a comparação de sequências proteicas traduzidas da construção com bancos de dados universalmente reconhecidos, por meio de alinhamentos entre sequências. Esta abordagem se justifica pelo fato de que sabidamente estruturas tridimensionais similares requerem certos níveis de conservação nas sequências de aminoácidos das proteínas envolvidas, e que ferramentas padrão de alinhamento, como o BLAST, podem buscar proteínas similares em meio a milhões de outras sequências.

O estudo se baseou na escolha dos bancos de dados, na execução das comparações e na seleção, dentre os alinhamentos resultantes, daqueles que demonstraram maior semelhança com proteínas contidas na alimentação humana. A partir destas comparações, foram selecionados 18 alinhamentos do produto Cel1 gene principal com proteínas presentes em diferentes alimentos, sendo que 10 destes alimentos são consumidos crus e os demais cozidos ou processados de alguma forma. Com relação ao produto NPTII do gene seletor, não foram encontrados alinhamentos significativos com proteínas presentes na alimentação humana (a não ser em alimentos geneticamente modificados). Estes resultados suportam a conclusão de que a ingestão do produto de Cel1 não deve ser prejudicial à saúde humana, visto que esta mesma proteína já faz parte da alimentação normal.

A análise bioinformática realizada envolveu a escolha dos bancos de dados, a execução das comparações, utilizando a ferramenta BLAST, e a seleção dos alinhamentos mais relevantes, tendo como base a comparação, por meio de

EM BRANCO

alinhamentos, das sequências dos genes introduzidos com sequências de proteínas de um banco de dados. Para este estudo, decidimos adotar o banco Não-Redundante (NR) do National Center for Biotechnology Information (NCBI), amplamente conhecido e utilizado na literatura, e onde são depositadas todas as sequências envolvidas em trabalhos científicos publicados.

Quando se fala em comparação de sequências específicas com uma grande quantidade de outras sequências num banco de dados, as ferramentas da família BLAST [1] são sem dúvida as primeiras opções a considerar. Foram feitas para este propósito e têm sido utilizadas no mundo todo como a ferramentas padrão para tais análises. Ferramentas da família FASTA [2] também foram bastante populares e poderiam ser usadas. No presente caso, como existe uma interface web para BLAST oferecida pelo NCBI para comparações utilizando seus próprios bancos, tornou-se muito conveniente utilizar este esquema. Portanto, optou-se pela família BLAST.

Como o interesse é comparar os produtos dos genes, a comparação deve ser feita em nível de amino-ácidos, ou seja, utilizando a tradução dos genes da construção através do código genético e buscando num banco de proteínas. A ferramenta específica da família BLAST para esta tarefa é o BLASTP.

A comparação dos produtos dos genes da construção com o banco NR, mesmo que reduzido, leva a grande quantidade de alinhamentos. Consequentemente, focou-se em alinhamentos de altíssima qualidade, com identidade de pelo menos 50 % e com e-value até $1,0 \times 10^{-50}$, ou seja, com grande chance de as duas proteínas comparadas se dobrarem da mesma forma e exercerem funções bioquímicas idênticas. Além disso, foram selecionados alinhamentos que cubram pelo menos 90 % da proteína buscada.

Vários destes alinhamentos correspondem a plantas e outros organismos não comestíveis, e que, portanto, não apresentam relevância neste estudo. Devido a isto, foi preciso realizar uma nova seleção dentro deste conjunto, destacando os alinhamentos que fossem com proteínas presentes em alimentos. Desta forma, alcançou-se a observação de 18 alimentos diferentes, sendo que vários deles possuem mais de um alinhamento com a proteína buscada.

Em adição, decidiu-se incluir um alinhamento com trigo, mesmo estando fora dos limites buscados (identidade de 38 %), pela importância do trigo na alimentação humana. Observa-se, porém, que a proteína buscada neste caso (Cel1) é mais semelhante a uma da cevada do que à do trigo. Para os alimentos que apresentaram mais de um alinhamento, foi escolhido o mais expressivo, isto é, com menor e-value, maior identidade e maior cobertura, para ser apresentado nos resultados.

A seguir estão descritos alinhamentos de dez alimentos consumidos **crus** que mostraram proteínas semelhantes à Cel1:

Pepino

No alinhamento de Cel1 com pepino, mereceu destaque a proteína PREDICTED: endoglucanase 8-like [*Cucumis sativus*], cujo alinhamento cobriu 98 % do gene principal, com e-value = 0 e identidade de 82 %.

Morango

O morango foi um alimento em que Cel1 encontrou proteínas com grande semelhança. Foram mais de 10 alinhamentos (não exibidos neste relatório), com diferentes isoformas da mesma proteína, inclusive. O melhor deles, selecionado para

EM BRANCO

ser exibido, foi com a proteína endo-beta-1,4-glucanase [*Fragaria x ananassa*], cujo alinhamento cobriu 94 % do gene principal, com e-value = 0 e identidade de 84 %.

Tomate

Com relação ao tomate, o gene principal se mostrou extremamente semelhante à endo-1,4-beta-glucanase precursor [*Solanum lycopersicum*]. O alinhamento apresentou cobertura de 98 % de Cel1, com e-value = 0 e identidade de 79 %.

Pimentão

Uma cobertura de 94 % da proteína buscada, com e-value = 0 e identidade de 80 %, foi exibida no alinhamento de Cel1 com a proteína cellulase [*Capsicum annuum*] do pimentão, revelando alta semelhança entre as sequências destas proteínas.

Pêssego

Com cobertura de 93 % na proteína buscada, e-value = 0 e identidade de 63 %, Cel1 alinhou com uma sequência atribuída ao pêssego: hypothetical protein PRUPE_ppa025159mg, partial [*Prunus persica*].

Olho de dragão - longan

A fruta olho de dragão, ou longan, popular em países asiáticos, teve uma proteína cuja sequência apresentou um bom alinhamento com Cel1: endo-1,4-beta-glucanase [*Dimocarpus longan*]. Para este alinhamento, a cobertura da proteína buscada foi de 97 %, e tivemos também e-value = 0 e identidade 62 %.

Uva

Dos alinhamentos da proteína gerada pelo gene principal com proteínas de uva, merece destaque um que cobriu 95 % da Cel1, com e-value = 0 e identidade de 63 %. A proteína cujo alinhamento resultou nestes valores foi a PREDICTED: endoglucanase 24 [*Vitis vinifera*].

Pera

O produto do gene cel1 revelou-se similar a proteínas da pêra, especialmente à endo-1,4-beta-glucanase 2 [*Pyrus x bretschneideri*] (pois a identidade foi de 50 %). O alinhamento entre estas proteínas proporcionou ainda cobertura de 94 % do produto buscado, com e-value = $9e^{-159}$.


Maçã

O alinhamento de Cel1 com a proteína endo-1,4-beta-glucanase [*Malus domestica*] da maçã cobriu 97 % de Cel1, com e-value = 0 e identidade de 56 %, o que confirma grande similaridade entre a proteína do gene principal e a proteína da maçã.

Melão

O produto do gene principal obteve um bom alinhamento com a proteína do melão endo-1,4 beta-glucanase [*Cucumis melo* subsp. melo]. Isto pode ser verificado pelos valores de cobertura de 93 % da proteína buscada, com e-value = 0 e identidade de 58 %.

EM BRANCO

1-8-5-1128


A seguir estão descritos alinhamentos de Cel1 com proteínas de alimentos consumidos por humanos de forma **cozida** ou **processada**.

Cacau

O alinhamento de Cel1 com a proteína do cacau Glycosyl hydrolase 9B1 isoform 1 [*Theobroma cacao*] exibiu cobertura extremamente alta, 99 % de Cel1, com e-value = 0 e identidade de 84 %.

Soja

Em relação à soja, Cel1 mostrou grande semelhança com a proteína PREDICTED: endoglucanase 8-like [*Glycine max*]. O alinhamento entre elas cobriu Cel1 em 99 % e apresentou e-value = 0, com identidade de 81 %.

Grão-de-bico

Em um alinhamento que apresentou 94 % de cobertura de Cel1, e-value = 0 e identidade de 83 %, esta se mostrou similar à proteína PREDICTED: endoglucanase 8-like [*Cicer arietinum*], do grão de bico.

Milho

Dentre os alinhamentos de Cel1 com milho, merece destaque aquele com a proteína endoglucanase 1 precursor [*Zea mays*], que cobriu 93 % da proteína buscada, apresentando e-value = 0 e identidade de 75 %.

Sorgo

O gene Cel1 também mostrou semelhança com a proteína hypothetical protein SORBIDRAFT_04g028790 [*Sorghum bicolor*] do sorgo; o alinhamento resultou em uma cobertura de 96 % de Cel1, e-value = 0 e identidade de 74 %.

Arroz

Em relação ao alimento arroz, Cel1 alinhou com boa pontuação (97 % de cobertura, e-value = 0:0 e identidade 73 %) com a proteína putative endo-1,4-beta-glucanase precursor [*Oryza sativa* Japonica Group].

Cevada

Com a cevada, Cel1 mostrou boa semelhança com cellulase [*Hordeum vulgare* subsp. vulgare]. O alinhamento proporcionou cobertura de 93 % em Cel1, com e-value = 0 e 75 % de identidade.

Trigo

Com o trigo, Cel1 mostrou boa semelhança com Coendobeta-1,4-glucanase [*Triticum aestivum*]; o alinhamento proporcionou cobertura de 91 %, e-value = $5e^{-80}$ e 38 % de identidade.

Observando-se os alinhamentos destacados, resultantes da comparação de Cel1 com o NR, utilizando a ferramenta BLAST, foi possível observar significativa semelhança entre a sequência Cel1 e sequências proteicas de alimentos de consumo humano. O mesmo não pode ser dito para a sequência NPTII, o seletor, pois este

EM BRANCO

1. 05.01.28
[Handwritten signature]

alinhou-se principalmente com sequências de vetores, bactérias, vírus e com proteínas de construções transgênicas.

Dos 18 alimentos selecionados como representantes do NR para terem seus alinhamentos com Cel1 exibidos, dez (10) são comumente consumidos de maneira crua; enquanto outros oito (8) são consumidos após preparo (cozidos, ou como ingredientes, caso do trigo). Este estudo suporta a conclusão de que organismos que possuem sequências altamente similares à de Cel1 estão presentes em diversos alimentos consumidos pela humanidade.

Com respeito à NPTII, foram encontrados alinhamentos relevantes apenas com organismos transgênicos consumidos como alimentos por humanos. Provavelmente isto se deve ao uso, nestas construções inseridas em alimentos, de um gene seletor semelhante a *nptII*.

2. Possíveis efeitos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão de OGM e seus derivados.

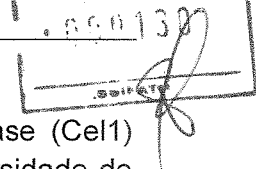
A bibliografia científica existente e passível de acesso sobre os derivados de eucalipto utilizados na alimentação humana e de animais domésticos foi consultada. *In natura*, nenhum órgão de eucalipto é consumido por humanos ou animais destinados ao consumo humano.

Como interface com a alimentação, alguns pontos podem ser destacados, discutidos a seguir. As flores de eucalipto estão entre as mais visitadas por abelhas, especialmente *Apis mellifera*, para a produção de mel. Assim, mel e própolis, devidamente processados pelas abelhas, podem ser considerados derivados consumidos por humanos. Além destes, óleos essenciais de eucalipto são industrialmente obtidos de espécies e plantios destinados exclusivamente para este fim, como *Corymbia citriodora* e *Eucalyptus globulus*, por exemplo, e utilizados na produção de alimentos e cosméticos, o que não se encaixa no presente caso. Finalmente, parte pouco significativa da celulose produzida industrialmente pode ser convertida em "celulose solúvel", utilizada pela indústria farmacêutica como veículo de comprimidos e cápsulas, e pela indústria de alimentos na produção de salsichas, embutidos e sorvetes.

O eucalipto, desta forma, não pode ser considerado, essencialmente um alimento humano, pois não é consumido, no seu todo ou em partes, diretamente pelo homem. Algumas espécies ou variedades são utilizadas exclusivamente para a produção de membranas ou essências, o que não é válido para *E. grandis* ou *E. urophylla*, bem como seus híbridos, caso do organismo parental do presente processo, por se tratarem de espécies com variedades ligadas e melhoradas, principalmente, à produção de madeira para celulose ou para energia.

Ainda que subprodutos ou derivados venham a conter componentes do eucalipto evento H421 (como néctar ou pólen, no caso do mel, por exemplo), não existem efeitos potenciais ligados à ingestão de seus produtos diferenciais em relação ao eucalipto convencional. Endoglucanases, como a Cel1, são enzimas que já estão presentes na alimentação humana, seja em alimentos consumidos diretamente, na sua forma crua, ou em alimentos que passam por diferentes graus de processamento, conforme pode ser verificado na resposta à pergunta anterior. Os alinhamentos *in*

EM BRANCO



silico para determinar a identidade e a similaridade da 1,4- β -endoglucanase (Cel1) com proteínas presentes na alimentação humana e animal mostram a diversidade de alimentos que contêm formas de alto grau de similaridade e identidade com a enzima expressa no eucalipto evento H421 (ver resposta à **Item n. 1 – Parte VI**).

Portanto, com base na avaliação realizada, não são esperados efeitos adversos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão do eucalipto evento H421, das proteínas nele expressas ou de seus derivados. Numerosos fatores podem ser considerados nessa avaliação de segurança, sendo que maiores detalhes sobre cada estudo serão fornecidos em questões específicas nessa mesma parte do presente documento. A seguir, o que se apresenta é um resumo dos resultados encontrados, os quais permitiram estabelecer conclusões sobre a segurança do eucalipto evento H421 e das suas proteínas Cel1 e NPTII. São elas:

O mel e bolotas de pólen produzidos a partir do evento H421, bem como as colônias de *Apis mellifera* instaladas na área experimental com o eucalipto geneticamente modificado, não apresentaram características distintas dos produtos de área de eucalipto convencional;

A composição química e as características fenotípicas, exceto pelo maior crescimento apresentado pelo evento H421, não foram afetados em relação ao controle convencional clone SP530;

O organismo doador, *Arabidopsis thaliana*, não tem histórico de uso na alimentação, mas é da família das Brassicáceas, que inclui espécies largamente consumidas por humanos e animais, dentre elas a couve, o repolho, o brócolis, o rabanete, o nabo, a rúcula, para citar alguns. Não há evidências de efeitos tóxicos ou alergênicos relacionado ao consumo de plantas desta família;

A proteína Cel1 é uma enzima do grupo das hidrolases, uma endoglucanase com alto grau de similaridade e identidade com enzimas encontradas em uma diversa gama de alimentos consumidos pelo homem ou por animais, como o morango, o tomate, o pêssego, o melão, o sorgo e outros;

As proteínas expressas no evento H421 não apresentam identidade ou similaridade significativa com toxinas ou alergênicos conhecidos;

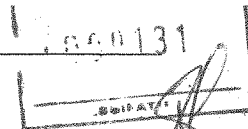
O nível de expressão das proteínas Cel1 e NPTII nos tecidos de eucalipto, bem como no seu pólen, são extremamente baixos, representando menos que 0,35 % e 0,003 % do total de proteínas extraído, respectivamente;

Os testes toxicológicos realizados com organismos indicadores, utilizando-se tecidos, mel ou pólen do eucalipto evento H421, não apontaram qualquer efeito sobre microrganismos, minhocas, abelhas, microcrustáceos e peixes;

As observações sobre populações e comunidades de artrópodes visitantes nos campos experimentais não indicaram efeitos de favorecimento ou seleção a espécies ou grupos de animais.

Utilizando guias de avaliação internacionalmente aceitos e recomendados por agências de regulamentação e organizações como OECD, FAO e WHO, o tipo de avaliação seguindo os passos acima mencionados é tido como suficiente para demonstrar a segurança das plantas geneticamente modificadas do eucalipto evento H421. A conclusão, tomando em conta todos os resultados acima mencionados, é de que não há preocupações quanto aos organismos doadores e quanto às proteínas Cel1 e NPTII presentes no eucalipto geneticamente modificado. O eucalipto historicamente não tem uso direto na alimentação humana ou na formulação de rações para animais. O uso do néctar e pólen por abelhas, melíferas ou nativas, para a

ENCLOSURE



elaboração de mel a partir de plantas de eucalipto geneticamente modificado evento H421 não se mostrou prejudicial ou diferente, tanto às populações de animais expostos como à qualidade dos produtos gerados (mel, própolis ou bolotas de pólen). Maiores detalhes sobre os estudos realizados e seus resultados são apresentados nas questões subsequentes do presente documento, que tratam de avaliação de risco à saúde humana e animal.

3. As diferenças de composição química e nutricional entre o alimento oriundo do vegetal geneticamente modificado e do vegetal não modificado, in natura ou após processamento e a existência de equivalência substancial entre o OGM e seu organismo parental.

Conforme demonstrado na resposta ao **Item n. 16 da Parte V** deste relatório, não foram encontradas diferenças de composição química, segundo os resultados da análise bromatológica realizada entre o eucalipto evento H421 e o seu controle convencional clone SP530. Da mesma forma, os aspectos fenotípicos avaliados não apresentaram diferenças significativas, exceto pelo maior desenvolvimento das árvores, que geram aumento de produtividade da madeira, objetivo da característica principal do evento H421, obtida a partir da introdução do gene *cel1*.

O eucalipto não é uma planta alimentícia, uma vez que não é empregado direta ou indiretamente na produção de matéria-prima ou ingredientes na alimentação humana ou animal. Uma vez que o eucalipto é uma fonte significativa de néctar e pólen na produção de mel, foram conduzidas análises para verificação e comparação das propriedades físico-químicas, caracterização do pólen e quantificação de material geneticamente modificado em mel produzido em área experimental de árvores geneticamente modificadas e em produto obtido em área comercial de eucalipto convencional.

3.1. Análises de composição do mel

A FuturaGene, em conjunto com apicultores da região, instalou no ano de 2011, na mesma área experimental de eucaliptos geneticamente modificados implantada em 2007 e em área de produção de eucalipto convencional localizada a 85 km de distância da área com plantas GM, colmeias de abelhas em caixas modelo Langstroth para coletar amostras de bolotas de pólen e mel, a fim de conduzir análises para avaliar a qualidade dos produtos e para utilizar em estudos de exposição em dietas de abelhas, verificando o efeito de produtos obtidos em campos de árvores transformadas geneticamente comparando com produtos oriundos de campos de árvores convencionais.

O verão entre 2011 e 2012 foi bastante seco, e as colmeias, em ambos os locais, sofreram com a falta de água e de espécies para pasto. A produção de mel foi escassa e em cada uma das áreas, uma das três colmeias instaladas colapsou e se extinguiu.

Na estação de florescimento seguinte, foram repostas as colmeias que haviam morrido e instaladas mais duas novas colônias por área, a fim de garantir a produção suficiente para as análises.

O florescimento das áreas foi acompanhado e a coleta de mel realizada em abril de 2013, logo após o final do período de florescimento das plantas de eucalipto. Antes

do período esperado de florescimento do eucalipto, os favos contendo mel produzido na estação anterior foram retirados, para evitar a mistura de diferentes fontes de nectar e pólen, concentrando a coleta na época de maior disponibilidade de flores de eucalipto, em ambas as áreas de produção escolhidas pela FuturaGene. O método de coleta de bolotas de pólen também foi adequado, realizando-se coletas com a tela na entrada das caixas em períodos de, no máximo, quatro horas, a fim de não provocar stress nas colônias.

Amostras de mel foram enviadas ao laboratório especializado para a realização de análises físico-químicas, segundo o determinado na regulamentação brasileira para identidade e qualidade do mel de abelhas. Foram incluídas nas análises amostras de três meis comerciais, produzidos em regiões próximas das áreas escolhidas pela FuturaGene, para uso como referências e estabelecimento dos intervalos para cada parâmetro analisado. Os resultados são apresentados na **Tabela VI.2**.

Tabela VI.2. Resultado médio das Análises Físico-químicas em amostras de mel obtidas de colmeias localizadas em área experimental com eucalipto geneticamente modificado (Área GM) e em área de produção convencional.

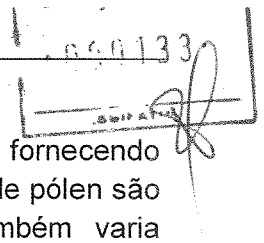
Parâmetro	Amostra					
	Área GM	DP	Área Controle	DP	Intervalo*	
Proteínas (g/100g)	0,43	0,09	0,33	0,12	0,25 -	0,31
Açúcares (g/100g)	72,34	1,90	70,45	2,30	73,84 -	77,50
Redutores (g/100g)	75,73	2,15	73,36	1,96	73,99 -	76,39
Não-redutores (g/100g)	0,40	0,19	0,76	0,50	1,27 -	3,55
Acidez (meq/kg)	48,67	11,49	52,51	1,85	24,36 -	42,88
Umidade (g/100g)	17,85	0,53	17,25	0,96	17,8 -	18,2
Insolúveis em Água (g/100g)	0,13	0,15	0,03	0,01	0,01 -	0,03
Cinzas (g/100g)	0,33	0,12	0,37	0,09	0,14 -	0,36
Reação Fiehe	ausente	-	ausente	-	ausente	ausente
Reação Lugol	ausente	-	ausente	-	ausente	ausente
Reação Lund (mL)	1,85	0,19	1,60	0,16	1,4 -	1,6
Hidroximetilfurfural (mg/kg)	4,13	0,87	2,99	1,13	4,18 -	9,50
pH	3,97	0,15	3,94	0,06	3,90 -	4,04

*valores determinados para amostras comerciais

As amostras foram também encaminhadas para análise palinológica, com quantificação e identificação dos tipos polínicos presentes em cada mel.

A caracterização dos grãos de pólen em mel, bem como sua quantificação, permite uma avaliação da flora visitada pelas abelhas produtoras de mel em uma determinada região (Kerr *et al.*, 1987). Os resultados aqui apresentados permitem uma avaliação das principais espécies de plantas visitadas pelas abelhas melíferas. Os requisitos alimentares básicos de abelhas são preenchidos pela coleta de néctar, grãos de pólen e água, sendo o néctar a fonte primária de carboidratos, também fornecendo vários minerais, cálcio, cobre, potássio, magnésio e sódio, variando conforme a espécie de planta. Os grãos de pólen são a principal fonte de proteínas

EM BRANCO



para as abelhas, vital para o desenvolvimento das larvas e abelhas jovens, fornecendo também lipídios, minerais e vitaminas. As proteínas adquiridas dos grãos de pólen são essenciais para o crescimento das colmeias e sua composição também varia conforme a espécie de planta onde as abelhas buscam seu alimento (Ellis *et al.*, 2013).

Para a caracterização dos tipos polínicos observados nas amostras de mel, estas foram preparadas pelo método da acetólise (Erdtman, 1952) para que os grãos de pólen presentes sejam mais bem visualizados e identificados. A identificação foi feita por comparação com o laminário referência e o banco de imagens do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP e consultando bibliografia especializada (Barth, 1989; Roubik & Moreno, 1991; Moreti *et al.*, 2002). A identificação polínica foi realizada em nível de Família, Gênero ou até Espécie, conforme a disponibilidade de material de referência.

Para a tipificação dos grãos de pólen presentes no mel, foram montadas três lâminas para cada amostra. Foram identificados e contados, no mínimo, 900 grãos de pólen por amostra e, em seguida, calculada a porcentagem de representação de cada um dos tipos polínicos. O total dos grãos de pólen presentes nas amostras foi determinado em hematocítômetro, ou câmara de Neubauer, que possibilita estimar o número de grãos presentes em amostras líquidas.

Para esta quantificação, as amostras foram diluídas em água destilada na proporção 1:1 e uma alíquota de 10 µL colocada em câmara de Neubauer (hematocítômetro) para a contagem do número de grãos de pólen. Foram contados os grãos presentes nos 16 quadrantes grandes e para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula abaixo. Todas as amostras foram submetidas a 10 contagens, sendo calculada a média para cada amostra da seguinte forma:

Número de grãos

$$\frac{\text{Número de grãos}}{16(\text{quadrantes}) \times 2(\text{diluição}) \times 10^4}$$

Os resultados são apresentados na **Tabela VI.3**. Não foram observadas diferenças significativas entre o número de grãos de pólen encontrados nas amostras das colmeias instaladas em área com plantas geneticamente modificadas e daquelas instaladas em área comercial convencional. A variabilidade deste tipo de dado é muito grande, pois depende da condição das colmeias e da paisagem encontrada em cada local. Vale destacar que a área com plantas de eucalipto geneticamente modificado apresentava à época somente os plantios experimentais de eucalipto, com poucas plantas em florescimento, sendo ocupada em grande parte por campos de gramíneas. A área de produção convencional comercial é toda composta de plantio de eucalipto, com grandes extensões ocupadas pela cultura em estágio de plantas adultas, em pleno florescimento.

EM BRANCO

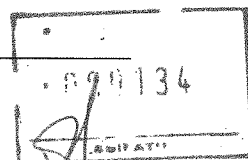


Tabela VI.3. Contagem de grãos de pólen em amostras de mel, 2013.

Número de grãos de pólen X 10 ⁴ /mL de mel		
Tratamento	Média	DP
Área GM	1604,2	1352,5
Área convencional	1020,8	628,7
RC-1	500,0	216,5
RC-2	2208,3	401,8
RC-3	2500,0	330,7

Obs.: Não há diferença significativa entre o evento H421 e o controle convencional SP530 pelo teste t de Student, nível de significância de 5 %.

Os tipos polínicos observados nos dois lotes de amostras variaram, sendo provenientes de diferentes regiões ou épocas de coleta, e os tipos polínicos observados caracterizam as espécies encontradas em cada local onde estavam localizadas as colmeias. A caracterização dos grãos de pólen é trabalhosa, requerendo grande experiência para o reconhecimento dos mesmos, além de boas referências para comparação. Na **Figura VI.2** é possível visualizar a presença de diferentes tipos polínicos em alguns dos quadrantes avaliados, ilustrando a forma como a caracterização e contagem dos diferentes tipos é realizada. Praticamente a totalidade dos grãos avaliados nas amostras de mel foi identificada, sendo os tipos predominantes apresentados na **Tabela VI.4**.

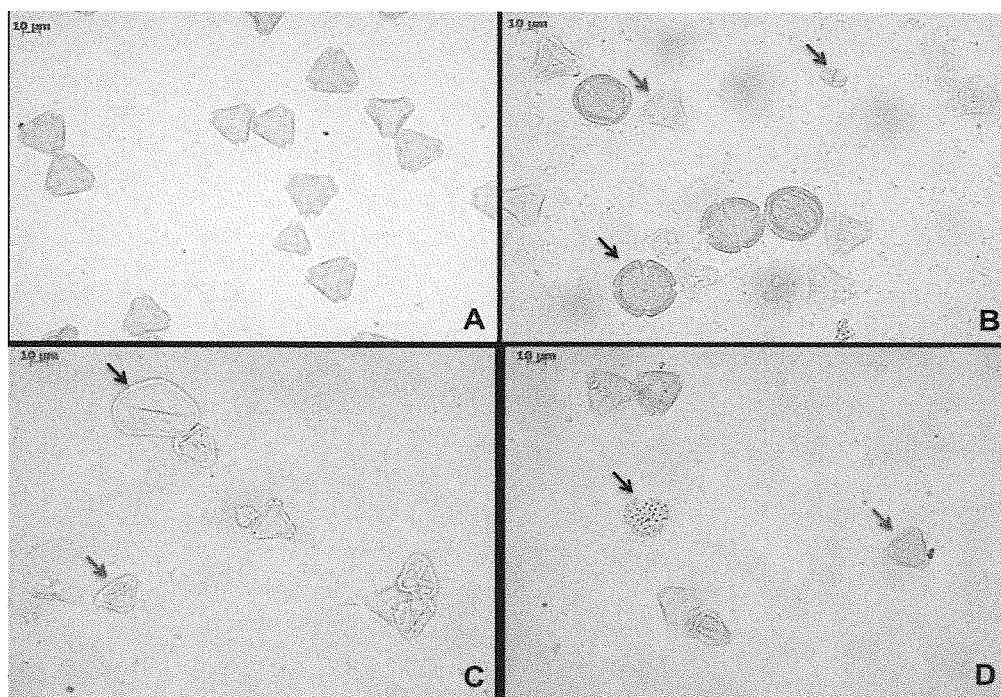
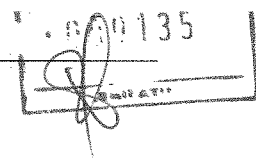


Figura VI.2: Ilustração de alguns tipos polínicos observados nas amostras de mel, após preparo por acetólise. **A.** Grãos de pólen de *Eucalyptus* sp. **B.** Grãos de pólen de *Eucalyptus* sp. (seta vermelha), *Citrus sinensis* (seta preta) e *Mimosa caesalpinifolia* (seta azul); **C.** Grãos de pólen de *Arecaceae* (seta preta) e *Eucalyptus* sp. (seta vermelha); **D.** Grãos de pólen de *Eucalyptus* sp. (seta vermelha) e *Asteraceae* (seta preta).



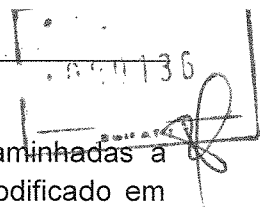
Observou-se que uma das amostras produzida em área com eucalipto geneticamente modificado era composta basicamente de grãos de pólen de citros (41 a 47 %) e eucalipto (46 a 55%). Geralmente grãos de pólen de citros, *Citrus sinensis* (Rutaceae), não são observados em altas porcentagens em amostras de mel, por esta espécie apresentar grandes quantidades de néctar. Esta ocorrência pode ter se dado pela forma de retirada do mel dos favos, realizada por escorrimento em que, por consequência, grãos de pólen existentes na parte externa das mesmas são carregados para as amostras de mel. Nas amostras da área experimental com plantas de eucalipto GM, de 32 a 55 % dos grãos eram de eucalipto e o restante variou entre outras espécies como, *Arecaceae* (palmeiras), *Asteraceae*, *Cecropia* sp (embaúba), *Fabaceae* (leguminosas) *Mimosa caesalpinifolia*, *Miconia* sp (quaresmeira), caracterizando-os como méis poliflorais. Vale destacar que a paisagem desta área, diferentemente das outras áreas de produção comerciais, só apresentava a parcela experimental de cerca de 1,3 ha de eucalipto em florescimento, sendo ocupada em sua grande parte por gramíneas e outras plantas forrageiras espontâneas. Nas amostras de mel comercial, a porcentagem de pólen de eucalipto foi predominante (73 a 86 %), com a presença em pequena porcentagem de *Arecaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, além de outras espécies com porcentagem bastante reduzida. As amostras da área controle convencional apresentaram predominância de pólen de eucalipto, entre 90 e 98%, com valores bastante reduzidos de outras espécies, principalmente *Cecropia* sp.

Em análises da origem botânica do mel, alguns dos tipos polínicos aqui listados como: *Cecropia* sp (gênero ao qual pertence a embaúba), *Poaceae* (família que compreende todas as gramíneas), *Zea mays* (milho), normalmente não são considerados na porcentagem de representação de cada tipo polínico, uma vez que estas plantas fornecem apenas pólen como recurso proteico para as abelhas, não sendo fonte de néctar para a produção do mel. Estas espécies, no entanto, são consideradas em estudos de origem geográfica do mel e outros estudos em que é importante a constatação da presença do tipo polínico na amostra.

Tabela VI.4. Tipos polínicos predominantes em cada amostra de mel coletada em área com eucalipto GM, área controle com eucalipto convencional e meis comerciais, 2013.

Tratamento	Tipo polínico %			
	Myrtaceae Eucalyptus sp.	Poacea	Fabaceae	Asteraceae
Área GM	46,8	5,1	7,3	3,9
Área Convencional	94,7	1,4	1,1	0,5
Comercial 1	85,6	1,8	5,1	1,7
Comercial 2	83,9	1,1	1,4	2,1
Comercial 3	73,5	1,3	2,2	6,6

As quantidades de pólen coletadas nas amostras de mel, juntamente com amostras de bolotas de pólen coletadas nas colmeias localizadas na área experimental contendo eucaliptos geneticamente modificados e nas colmeias



localizadas em área de produção comercial convencional, foram encaminhadas a laboratório especializado para quantificação do pólen geneticamente modificado em relação ao pólen de eucalipto total.

A extração de DNA foi realizada de acordo com o kit da FastID, comercializado pela empresa GeneticID/USA. Foi utilizada 1 amostra de folhas de eucalipto evento H421 fornecida pela FuturaGene como Padrão de Referência, a qual foi extraída 6 vezes. O DNA das mesmas foi quantificado através de espectrofotometria e posteriormente diluído de forma apropriada para confecção da curva padrão. Foram estabelecidas 3 curvas-padrão nas concentrações de 10, 1 e 0,1 nanogramas/reação de DNA correspondendo a 10 %, 1 % e 0,1 % de OGM respectivamente. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Desenho de *primers* e sonda: para o gene alvo *nptII*, foi utilizado o kit da GeneticID/USA com uma sonda Taqman marcada com VIC. Por outro lado, o kit para detecção do gene de referência foi desenvolvido pela empresa EcoCerta Biotecnologia com 100 % de homologia com *Eucalyptus grandis*. Para o desenvolvimento dos *primers* e sonda foi utilizado o gene Leafy/Floricouly (LFY1) depositado no NCBI sob o número de acesso AY640313. A sonda para o gene de referência foi marcada com o fluoróforo FAM.

Para quantificação das amostras de eucalipto geneticamente modificado foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{quantidade em ng de DNA amplificado do gene alvo } nptII \times 100}{\text{quantidade em ng de DNA amplificado do gene de Referência LFY1}}$$

O resultado é expresso em porcentagem (%). Essa base de cálculo é comumente empregada para avaliar de forma quantitativa outros transgênicos como: soja, milho, algodão, canola entre outros.

As curvas padrão (gene alvo e referência) foram realizadas em 3 concentrações distintas: 10 %, 1 % e 0,1 %. A equação da reta apresentou um $r^2=0,995$ para o alvo e $r^2=0,998$ para o gene de referência. De uma forma geral, os valores foram satisfatórios para estimar a quantificação de OGM presente nas amostras (**Figura VI.3**).

EM BRANCO

137
11/11/2011

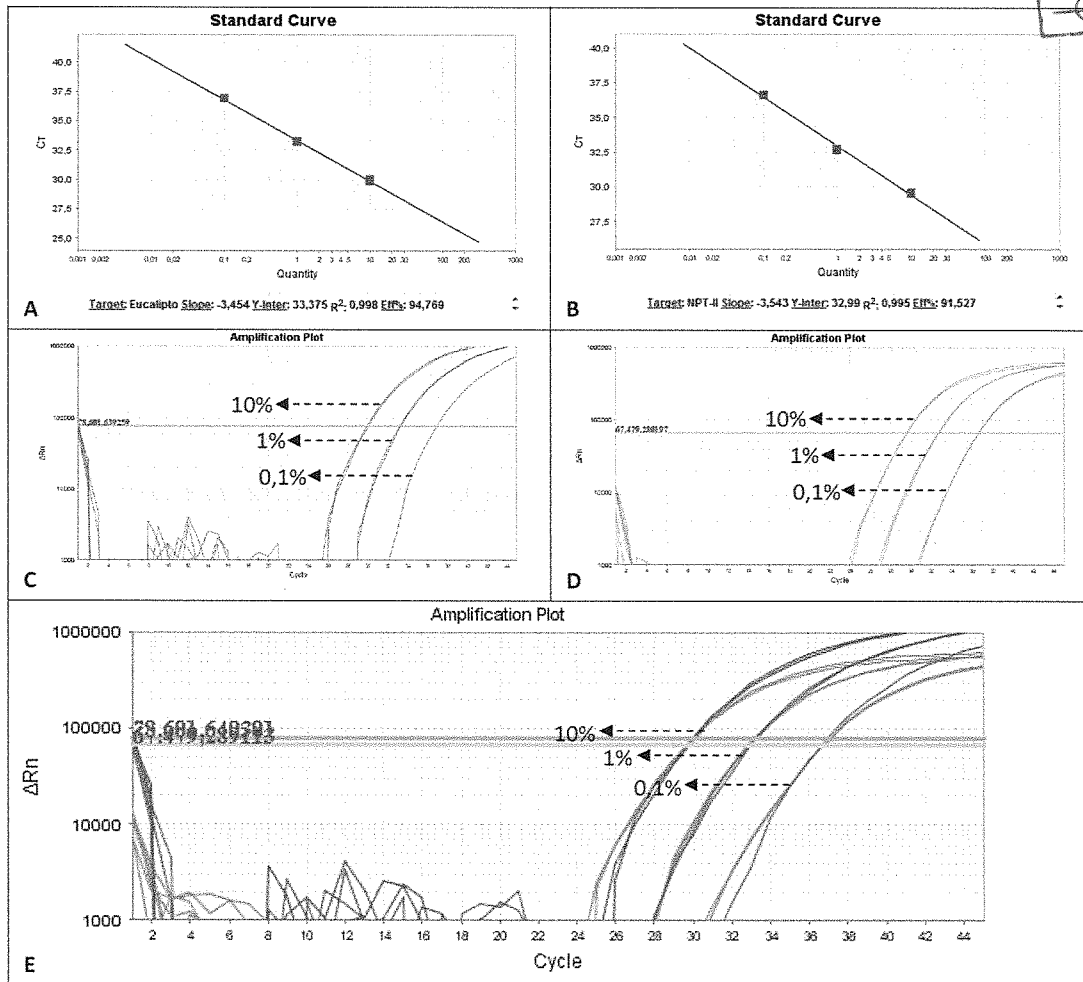


Figura VI.3. Gráfico representando a linearidade da curva padrão obtida para o gene de referência em Eucalipto (A). Gráfico representando a linearidade da curva padrão obtida para o gene alvo *nptII* em eucalipto (B). Curvas padrão e suas respectivas concentrações, indicadas pelas setas, para o gene de referência em eucalipto (C). Curvas padrão e suas respectivas concentrações, indicadas pelas setas, para o gene alvo *nptII* em eucalipto (D). Convergência entre as curvas padrões do gene de referência (vermelhas) e do gene alvo *nptII* (azuis), com suas respectivas concentrações indicadas por setas.

Os resultados obtidos no gene de referência comprovam em todos os casos a presença de DNA de eucalipto. Entretanto, a quantidade de DNA extraído foi maior nas amostras de bolotas de pólen quando em comparação ao pólen proveniente de amostras de mel (Figura VI.4).

EM BRANCO

138

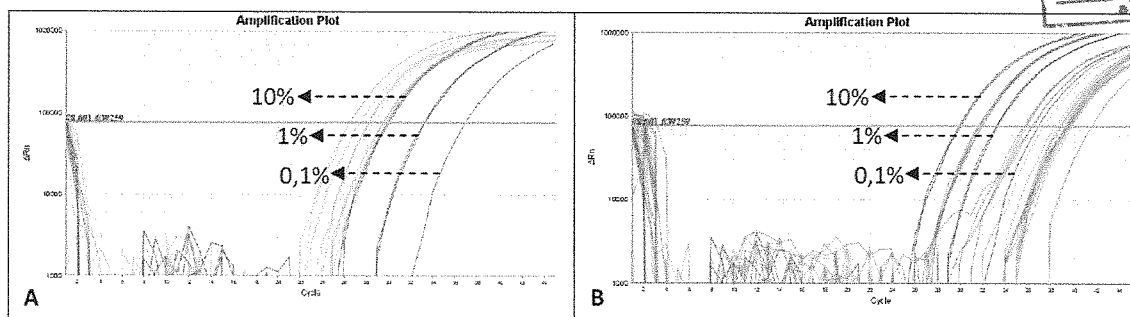


Figura VI.4. Representação das curvas de amplificação correspondentes a amostras de bolotas de pólen, onde se pode observar que todas as curvas encontram-se em concentrações superiores a 10 % (A). Representação das curvas de amplificação correspondentes a amostras de pólen provenientes de mel, onde podemos observar que a grande maioria das curvas encontra-se em concentrações inferiores a 1 % (B).

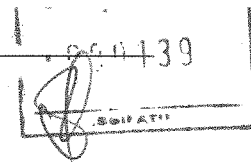
Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela VI.5** abaixo.

Tabela VI.5. Número, a descrição da amostra, ano de coleta e o respectivo resultado de conteúdo de eucalipto GM obtido para cada amostra.

No.	Descrição da Amostra	Ano da coleta	Resultado
1	Bolotas de Pólen Cabreúva – Caixa 1	2013	100% OGM
2	Bolotas de Pólen Cabreúva – Caixa 2	2013	84% OGM
3	Bolotas de Pólen Cabreúva – Caixa 3	2013	100% OGM
4	Bolotas de Pólen Cabreúva – Caixa 4	2013	100% OGM
5	Bolotas de Pólen Cabreúva – Caixa 5	2013	36% OGM
6	Bolotas de Pólen Cabreúva – Caixa 1	2013	0,15% OGM
7	Pólen extraído de mel – Cabreúva 1A	2013	100% OGM
8	Pólen extraído de mel – Cabreúva 1C	2013	100% OGM
9	Pólen extraído de mel – Cabreúva 2A	2013	100% OGM
10	Pólen extraído de mel – Cabreúva 2C	2013	100% OGM
11	Pólen extraído de mel – Cabreúva 3A	2013	100% OGM
12	Pólen extraído de mel – Cabreúva 3C	2013	100% OGM
13	Pólen extraído de mel – Cabreúva 5A	2013	Não detectado
14	Pólen extraído de mel – Cabreúva 5B	2013	0,3% OGM
15	Pólen extraído de mel – Estrela 6A	2013	Não detectado
16	Pólen extraído de mel – Estrela 3C	2013	10% OGM
17	Bolotas de Pólen – Faz. Cabreúva	-	71% OGM
18	Bolotas de Pólen – Faz. Estrela	-	Não detectado
19	Mel – Faz. Cabreúva	-	75% OGM
20	Mel – Faz. Estrela	-	Não detectado
21	Pólen Classificado (5C)	2013	*Inconclusivo

* O DNA do pólen Classificado 5C (amostra 21) apresentou níveis de degradação que impossibilitaram a análise.

Obs.: As amostras identificadas como (Faz.) Cabreúva são originadas de área experimental com árvores GM e aquelas indicadas como (Faz.) Estrela são originadas de área com plantio comercial convencional.



As quantidades de pólen geneticamente modificado nas amostras de bolotas de pólen da Fazenda Cabreúva, onde está localizado o experimento com árvores GM, variou entre 0,15 e 100,00 % de pólen GM. No mel a variação foi maior, com amostras nas quais não se detectou pólen GM até uma concentração de 100,00 % de pólen de eucalipto GM. Interessantemente, uma das amostras de mel coletada na Fazenda Estrela, distante mais de 85 km da área com árvores GM, apresentou 10 % de pólen GM. Como a análise de conteúdo de organismos geneticamente modificados se baseou na presença do gene *nptII*, é mais provável que o pólen GM quantificado na amostra desta localidade distante do campo experimental com árvores transformadas seja, na verdade, pólen de algodão geneticamente modificado aprovado para cultivo, que apresenta a mesma sequência inserida.

O projeto "Criação do CDA *Eucalyptus*: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para a Biossegurança Relativa a Plantas GM de Eucalipto", da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento (MAPA) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), coordenado pelo Prof. Dr. Giancarlo Pasquali da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS conduziu um estudo para verificar o impacto das plantas geneticamente modificadas de eucalipto sobre a qualidade do mel e sobre o comportamento de colmeias de abelhas melíferas. Para a execução dos estudos, um total de 12 caixas de abelhas (*Apis mellifera*) do modelo Langstroth foram distribuídas no centro do plantio de árvores GM de eucalipto (3 caixas), a uma distância de 400 m do plantio em campo aberto (3 caixas), no interior de um maciço florestal não-GM de eucalipto localizado a 1.000 m de distância (3 caixas) e a 85 km de distância da área experimental, também no interior de um plantio comercial de eucalipto. Esta configuração de experimento foi realizada no verão 2010-2011. Amostras de mel foram coletadas, identificadas por códigos e distribuídas entre diferentes laboratórios para as análises. O grupo da Dra. Betina Blochtein (PUC-RS) realizou análises microscópicas do mel para a confirmação de sua origem, a partir da identificação de grãos de pólen de eucalipto. As amostras coletadas de mel foram confirmadas como sendo eminentemente de *Eucalyptus*, embora grãos de pólen de outras espécies vegetais, inclusive de milho, foram também detectados.

Amostras de pólen extraídos do mel foram encaminhadas para a detecção de transgenes e determinação da proporção de DNA de plantas GM e não-GM. Análises bromatológicas das amostras de mel obtidas incluíram todos os itens obrigatórios referentes à composição do mel, conforme orientações do "Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel" (Processo Nº 21000.002119/2000-03 do MAPA e Resolução MERCOSUL GMC 89/99) aprovado pelo MAPA em 20/10/2000, por intermédio da Instrução Normativa Nº 11. Um total de 26 amostras identificadas por códigos, cada uma consistindo de 50 mL de mel, foram encaminhadas aos Laboratórios ALAC para análises, sendo estas derivadas das 12 caixas de abelhas instaladas na área de experimentação com *Eucalyptus* conforme descrito no item // acima. As análises incluíram os seguintes ensaios: Açúcar não redutor em sacarose, Açúcar redutor em glicose, Açúcar total em glicose, Carboidratos, Resíduo mineral fixo, Colesterol, Fibra alimentar total, Gordura saturada, Lipídios, Proteína, Umidade, Valor calórico.

1.59.140
LABORATÓRIO

O conjunto detalhado de resultados foi analisado pelo Grupo do Dr. Giancarlo Pasquali (UFRGS). Os valores para os itens (a) açúcares não redutores em sacarose, (f) colesterol e (g) fibra alimentar total foram próximos a zero ou indetermináveis para todas as 26 amostras, conforme esperado para mel natural. Os resultados das análises dos demais parâmetros (**Figura VI.5**) provaram não haver diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de mel coletadas de colmeias localizadas dentro da área de árvores GM em relação às amostras de mel coletadas de colmeias dispostas à distância de 1.000 m e a 85 km, sendo estas últimas amostras consideradas controles negativos (não-GM).

3.2. Análise de composição de própolis

Foi realizada análise em amostras compostas de própolis, coletadas das 5 caixas presentes em cada uma das áreas, um conjunto na área experimental com plantas de eucalipto geneticamente modificado de diferentes construções, entre elas o evento H421, e um conjunto em área comercial de eucalipto convencional, localizada a 85 km de distância da área com plantas GM.

Devido à grande quantidade requerida de material para condução das análises e o pequeno montante obtido nas caixas disponíveis para as avaliações, não foi possível obter resultados de repetições. As amostras compostas foram coletadas nos campos, identificadas e acondicionadas em sacos plásticos e enviadas ao laboratório para as análises, não sendo, portanto, diluídas em álcool ou outro solvente.

Os resultados obtidos para o conteúdo de proteína, umidade e cinzas indicam grande proximidade dos valores em relação aos componentes entre os produtos das colmeias da área GM, da área convencional e o produto comercial fornecido por apicultor da região, como pode ser verificado na **Tabela VI.6**.

Tabela VI.6. Análise de composição de amostras de própolis produzidas em colmeias de área com eucalipto GM, eucalipto convencional e própolis comercial, 2013.

Tratamento	Parâmetro analisado		
	Proteína Total (g/100g)	Umidade (g/100g)	Cinzas (g/100g)
Área GM	11,58	6,59	2,84
Área Convencional	11,27	6,25	3,06
Amostra Comercial	11,36	5,27	2,65

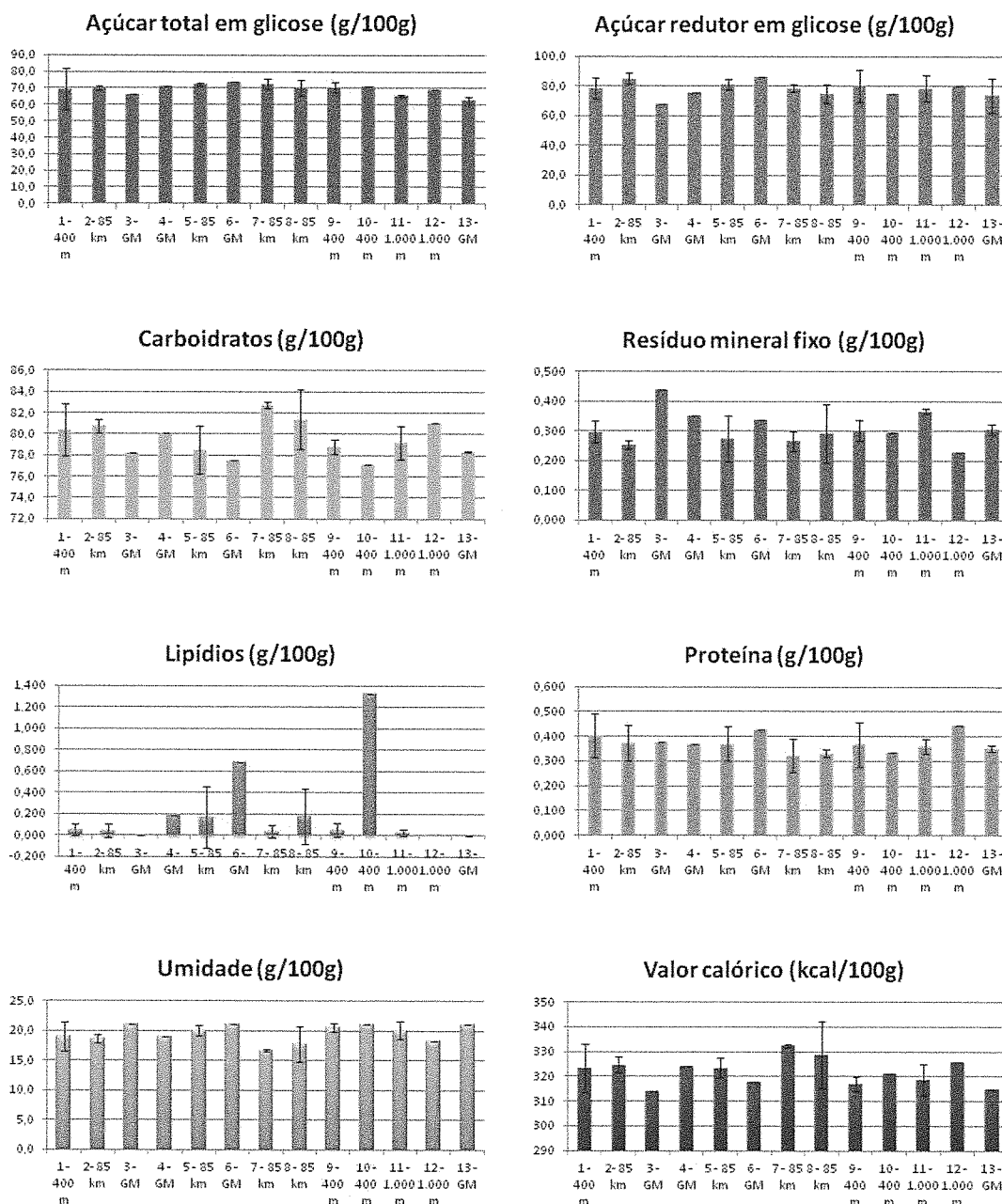
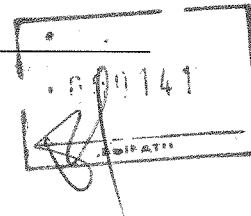
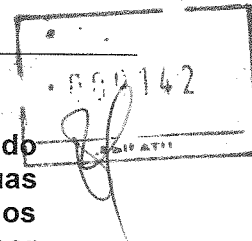


Figura VI.5. Análises bromatológicas do mel. Análises realizadas e unidades de medida estão indicadas. As amostras representam réplicas coletadas nas seguintes áreas: plantio de *Eucalyptus* GM (amostras 3, 4, 6 e 13); a 400 m do plantio GM (amostras 1, 9 e 10); a 1.000 m do plantio GM (amostras 11 e 12); e a 85.000 m do plantio GM, controles negativos (amostras 2, 5, 7 e 8). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros analisados nas amostras de mel coletadas de colmeias em área de eucalipto GM e convencional. Fonte: Relatório “CDA *Eucalyptus*”, Anexo I.

EM BRANCO



4. As alterações relativas ao desempenho do animal quando alimentado com organismos geneticamente modificados ou qualquer de suas partes, in natura ou após processamento, fornecendo, inclusive, os resultados da avaliação da nutrição em animais experimentais por duas gerações, indicando as espécies utilizadas nos testes, duração dos experimentos, variações fisiológicas e morfológicas observadas em relação aos grupos-controle e alteração da qualidade nutricional, se houver.

Como parte do projeto "Criação do CDA *Eucalyptus*: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para a Biossegurança Relativa a Plantas GM de Eucalipto", a partir das amostras de mel coletadas no experimento conforme o descrito no item anterior, o grupo da Profa. Dra. Betina Blochtein (PUCRS) realizou a avaliação de tais efeitos pela alimentação de larvas de abelhas nativas mantidas em colmeias artificiais de laboratório. Todas as amostras de mel, sejam aquelas provenientes da área de cultivo de eucalipto geneticamente modificado (GM), sejam as de 85 km de distância desta, provaram suas origens como eminentemente de flores de eucalipto, conforme esperado (**Figura VI.6**). A coleta e análise de larvas de *Apis mellifera* em desenvolvimento nas colmeias das áreas experimentais evidenciou total semelhança nas proporções dos distintos estágios de desenvolvimento dos imaturos encontradas nos favos ($p > 0,05$). Assim, pode-se inferir que as atividades de postura das rainhas estiveram regulares nos períodos amostrados, pois o padrão temporal e espacial de oviposição ocorreu de acordo com o esperado.

A anatomia de *Apis mellifera* foi avaliada, baseado em parâmetros universais (**Tabela VI.7**). As análises alométricas foram realizadas com 35 pupas/favo, obtidos nas amostras referidas acima. Com auxílio de paquímetro digital, mensurou-se a largura da cabeça e a distância intertegular de operárias imaturas. Observaram-se diferenças nestes parâmetros entre abelhas provenientes de colmeias dispostas a 1.000 m ou a 400 m da área com eucalipto geneticamente modificado. No entanto, tais diferenças não foram observadas entre abelhas coletadas a 85 km e na própria área de cultivo dos vegetais GM, descartando-se efeito específico das proteínas recombinantes. Considera-se que estas diferenças evidenciadas nas análises alométricas são esperadas dado que as abelhas domésticas no Brasil atualmente representam populações híbridas com expressão fenotípica percebida em pequenas diferenças no tamanho dos indivíduos, coloração, resistência a patógenos e, até mesmo, no tamanho populacional das colmeias. Como as diferenças verificadas não estão progressivamente relacionadas à distância da área experimental descartou-se a hipótese de alterações ocasionadas por ingestão de pólen de eucalipto GM.

EM BRANCO

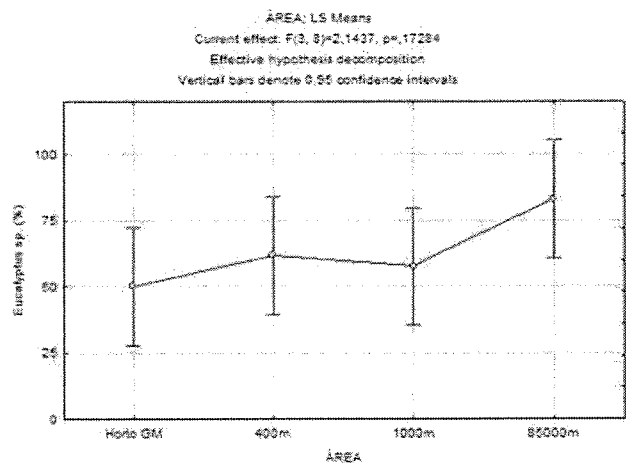
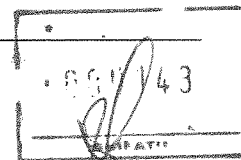


Figura VI.6. Resultado da análise da variância (ANOVA) das proporções (%) de grãos de pólen de eucalipto no mel de *Apis mellifera*. A localização das colmeias de onde as amostras de mel derivaram estão indicadas, sendo "Horto GM" a área de experimentação com eucalipto GM.

O grupo de pesquisa liderado pela Dra. Betina Blochtein (PUCRS) estabeleceu em laboratório colmeias artificiais (minicolônias) de espécies nativas de abelhas, de forma a alimentá-las com pólen proveniente de árvores GM e convencionais de eucalipto. As espécies avaliadas foram *Plebeia droryana*, *Melipona obscurior*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca angustula*. Pólen foi coletado diretamente de flores das árvores de eucalipto GM e convencional, e incorporado à dieta alimentar das abelhas em minicolônias. Para surpresa dos pesquisadores, abelhas adultas de *S. bipunctata* reduziram ou rejeitaram o pólen de eucalipto (seja GM ou convencional) oferecido nos alimentadores no interior das minicolônias. Este comportamento foi seguido pela destruição dos favos de cria recém-construídos pelas operárias e interrupção da construção de novas células assim como da atividade de postura pela rainha. Este comportamento não foi observado quando pólen comercial de eucalipto foi incluído nas dietas. O comportamento de rejeição adotado pelas abelhas possivelmente está relacionado à contaminação do pólen durante o processo de extração das flores.

Durante o processo manual de liberação do pólen das flores, o atrito de partes das plantas pode ter provocado a liberação de óleo de eucalipto, presente em grande parte dos tecidos vegetais da planta. O óleo de eucalipto possui propriedade inseticida, com alta toxicidade às abelhas, o que explicaria a resposta comportamental das operárias. Outro fator que pode ter influenciado o comportamento das abelhas frente ao pólen experimental é a ausência de manipulação prévia do pólen pelas abelhas para o seu consumo, uma vez que a coleta do pólen pelas operárias nas flores é acompanhada da adição de enzimas oriundas de glândulas das abelhas que provocam alterações químicas no pólen. As hipóteses levantadas reforçam-se pelo fato de que a literatura refere amplamente que muitas espécies de abelhas, inclusive as duas utilizadas no presente estudo, são ávidas por flores de eucalipto as quais possuem importante potencial apícola. Novamente, os efeitos observados foram

