

1. 06.11.14
BIOFAT
5

independentes da procedência do mel, seja ele derivado de colmeias localizadas no plantio de eucalipto GM ou às diferentes distâncias amostradas.

Tabela VI.7. Proporções (%) dos estágios de desenvolvimento encontrados nas porções central, média e borda dos favos coletados nas áreas de estudo, em março de 2011, na Fazenda Estrela (conv) e Cabreuva (GM).

Área (n favos) (n células)		Porção Central					Porção Média					Borda				
		PP	P1	P2	Im	Vazia	PP	P1	P2	Im	Vazia	PP	P1	P2	Im	Vazia
Horto GM (6) (364)	Mediana	0	1,04	80,21	0	6,25	0	0	78,13	0	4,167	0	0	77,08	1,04	7,29
	Mínimo	0	0	15	0	4	0	0	6,3	0	2,1	0	0	21,2	0	2,4
	Máximo	4,1	75,2	94,1	17	8,2	6,4	83,2	98,4	17	10,1	33,4	63,2	90,2	15,1	13,3
400m (9) (1296)	Mediana	0	0	91,67	0	6,25	0	4,17	85,42	0	6,25	0	4,17	85,42	0	8,33
	Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	0	0	0	0
	Máximo	96	81,2	98,1	2	15,4	81,2	81,1	96,28	8	21	71,2	73,1	94,5	6,3	15,1
1000m (9) (1296)	Mediana	0	0	79,17	0	8,33	2,08	6,25	79,17	0	8,333	4,17	14,6	75	0	8,33
	Mínimo	0	0	0	0	6,2	0	0	0	0	4,3	0	0	0	0	4,2
	Máximo	94	77,1	100	0	21,1	96,2	65,3	90	0	13,1	94,3	56,2	83,1	0	17,3
85000m (9) (1296)	Mediana	0	0	79,17	0	8,33	0	0	75	2	10,42	0	0	77,08	0	14,6
	Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Máximo	90	10,2	100	15	21,1	90,1	23,3	90,2	13	19,5	83,4	23,2	90,4	13,1	19,2

Obs.: (PP= Pré-pupa; P1= Pupa olhos brancos; P2= Pupa olhos pigmentados; Im= Imago).

Como conclusões gerais destes estudos, o grupo entendeu que a ingestão de pólen GM não causa danos deletérios às populações de *Apis mellifera*; a predominância de pólen de eucalipto nos méis documenta a importância desta fonte botânica para a nutrição das abelhas e como potencial apícola. Os resultados fazem parte do Relatório de conclusão do Projeto "Criação do CDA *Eucalyptus*: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para a Biossegurança Relativa a Plantas GM de Eucalipto", encaminhado ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa - CNPq, ANEXO I do presente documento.

5. A estabilidade à digestão e ao processamento industrial da proteína especificada pelo transgene com base nas propriedades físico-químicas.

O eucalipto não é um produto utilizado para alimentação humana ou animal, sendo seu maior uso direcionado para a produção de energia e de celulose. A enzima 1,4-β-endoglucanase (Cel1) expressa no eucalipto evento H421, conforme apresentado no presente documento, caracteriza-se por ser uma proteína de origem vegetal, isolada de *Arabidopsis thaliana*. Sua expressão promove o relaxamento das fibras da parede celular, permitindo o maior desenvolvimento das plantas, com atuação principal nos estágios iniciais de crescimento do eucalipto. Os estudos para avaliar a expressão da proteína Cel1 em diferentes materiais e tecidos das plantas transformadas, mostraram que a detecção só é possível no estágio inicial de cultura

000145

de tecidos, sendo impossível sua detecção ou quantificação em tecidos mais maduros, incluindo pólen, raízes e ramos, ou em mel e bolos de pólen produzidos em área com eucalipto GM, o que significa que a exposição à proteína é muito baixa ou inexistente.

Esta enzima apresenta alto grau de homologia com proteínas presentes no próprio eucalipto (endoglucanases endógenas) e em frutas e cereais presentes na dieta humana e animal, consumidos diretamente, *in natura*, ou com diferentes graus de processamento (ver resposta ao **Item n. 1 - Parte VI** do presente documento).

A proteína não tem histórico de apresentar qualquer efeito tóxico e a busca por similaridade com toxinas ou alérgenos não indicou proximidade da proteína Cel1 com quaisquer substâncias potencialmente perigosas ao homem ou a animais.

Adicionalmente, os estudos toxicológicos realizados com organismos indicadores (minhocas, microrganismos, peixes, microcrustáceos e abelhas) não indicaram qualquer efeito tóxico do evento H421 sobre estes, seja na exposição a tecidos ou ingestão de pólen, na comparação com a exposição a materiais convencionais de eucalipto. As observações ambientais conduzidas a campo, nas quatro áreas experimentais, em diferentes estações do ano, avaliando artrópodes de solo, de serapilheira e de parte aérea, não demonstraram qualquer diferença significativa entre as populações ou comunidades presentes nas parcelas de eucalipto evento H421 e seu controle convencional clone SP530.

Uma vez que a exposição por via digestiva à proteína especificada pelo transgene não deverá ocorrer e que os danos relacionados a esta proteína são irrelevantes, em função do exposto - o eucalipto não é uma espécie alimentícia; os níveis baixos ou inexistentes de expressão da proteína no evento H421 em diferentes tecidos, em mel e bolos de pólen produzidos em área com eucalipto GM; a proteína expressa é de origem vegetal e tem alta similaridade com endoglucanases presentes normalmente na alimentação humana e animal; a enzima não tem histórico de efeito tóxico ou alergênico e não apresenta identidade significativa com alérgenos e toxinas conhecidos; os resultados obtidos em ensaios toxicológicos com organismos indicadores e as avaliações ambientais realizadas não apontam impacto em espécies, populações ou comunidades; a semelhança na composição e outras características fenotípicas em relação ao eucalipto convencional - não se encontrou justificativa para a realização de uma avaliação específica da estabilidade desta à digestão e ao processamento industrial.

6. Os possíveis efeitos deletérios do OGM em animais prenhes e seu potencial teratogênico.

Se as culturas geneticamente modificadas e as proteínas exógenas nelas expressas não indicam alertas estruturais para efeitos adversos em animais prenhes e suas progênes, então não existe necessidade de realizar estudos de teratogênese para essas culturas. Como afirmado pela EFSA (2008), a maior parte dos estudos nutricionais com animais conduzidos até o momento não mostra evidência de efeitos adversos que poderiam sugerir a necessidade de estudos teratogênicos adicionais, como parte da avaliação de segurança alimentar das culturas geneticamente modificadas. A proteína exógena produzida no eucalipto evento H421 não é estrutural ou funcionalmente relacionada com proteínas tóxicas ou farmacologicamente ativas que possam ter efeito adverso sobre animais prenhes e sua progênie. Além disso, as

EN BRANCO

endoglucanases estão presentes em grande variedade de alimentos consumidos diretamente ou de forma processada, sendo praticamente nula a possibilidade de que essa proteína expressa em eucalipto geneticamente modificado resista à digestão no trato gastrointestinal. Portanto, a possibilidade de que essas proteínas exógenas sejam absorvidas de maneira intacta em quantidades suficientes e então entrem na circulação fetal é desprezível. Proteínas que são enzimas não demonstram produzir efeitos tóxicos ou ser teratogênicas para o sistema reprodutivo quando fornecidas em alimentos a roedores (Greenough e Everett, 1991; Flood e Kondo, 2004; Hjortkjaer *et al.*, 1993; Ashby *et al.*, 1987). Estudos de segurança realizados com inúmeras enzimas alimentares produzidas por fermentação não demonstraram evidências de que estas proteínas pudessem desencadear processos mutagênicos ou carcinogênicos em animais de laboratório (Pariza e Foster, 1983). Alguns estudos demonstraram que enzimas alimentares não têm efeitos mutagênicos nem teratogênicos em animais e bactérias (Stavnsberg *et al.*, 1986; MacKenzie *et al.*, 1989a, 1989b; Kondo *et al.*, 1994; Bergman e Broadmeadow, 1997; Dean, 1997). Assim, nos casos em que não existem alterações na composição da cultura geneticamente modificada que poderiam levantar questões sobre o potencial de teratogenicidade do produto, não se justifica a necessidade de condução de estudos de teratologia.

7. As conclusões de análises imunológicas e histológicas de tecidos relevantes, especialmente do trato digestivo.

De acordo com o exposto na resposta ao **Item n. 5 - Parte VI** deste documento, o eucalipto não tem histórico de uso na alimentação humana ou animal. A enzima expressa no eucalipto evento H421 é uma proteína vegetal que apresenta ação significativa durante o estágio inicial de desenvolvimento dos tecidos na planta, sendo sua expressão indetectável em tecidos crescidos e maduros.

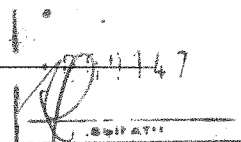
A enzima Cel1 de *Arabidopsis thaliana* tem alto grau de identidade e similaridade com endoglucanases endógenas do próprio eucalipto, assim como com proteínas que se encontram naturalmente em alimentos consumidos, *in natura* ou com diferentes graus de processamento, por humanos e animais, sem efeitos alergênicos ou tóxicos registrados. Foi avaliada a similaridade com alérgenos e substâncias tóxicas conhecidas, sem observação de proximidade da sequência com substâncias que representem risco a humanos ou animais.

Os níveis indetectáveis encontrados em tecidos do eucalipto evento H421 também se repetiram nas análises de detecção/quantificação realizadas em bolotas de pólen e mel coletados em colmeias instaladas em área experimental com eventos de eucalipto transgênicos em floração.

Ensaio ecotoxicológicos conduzidos com organismos indicadores (minhocas, microrganismos, peixes, microcrustáceos, abelhas) mostraram que a exposição a tecidos e pólen do eucalipto evento H421 não provocou efeitos distintos da exposição aos mesmos materiais de eucalipto convencional. As observações a campo de grande gama de artrópodes, em quatro regiões distintas, durante todas as épocas do ano, também não indicaram efeito sobre qualquer grupo, família ou espécie da mesofauna.

Uma vez que o eucalipto evento H421 não é utilizado como alimento, a enzima Cel1 não representa qualquer indício de risco e se encontra em níveis muito baixos de

EM BRANCO



expressão em grande parte dos tecidos do eucalipto evento H421, não são esperados efeitos imunológicos ou variações histológicas de tecidos relevantes do trato digestivo.

8. A capacidade do OGM de produzir toxinas ou metabólitos que causem efeitos adversos ao consumidor, animal ou humano, relatando as evidências experimentais.

Com base nos dados e informações apresentados em questões anteriores, os tecidos do eucalipto evento H421 são equivalentes aos do eucalipto convencional em termos de composição, e não há evidências que toxinas ou metabólitos secundários, não existentes em eucaliptos convencionais e que causem efeitos adversos à saúde humana e animal, sejam produzidos.

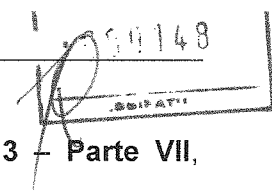
A observação das populações e comunidades visitantes dos campos experimentais de eucalipto transformado não apontou qualquer efeito adverso a qualquer espécie ou grupo de animais. Os ensaios toxicológicos não apontaram efeitos diferenciais do evento H421, quando comparado com seu controle convencional clone SP530, sobre microrganismos, minhocas, abelhas, microcrustáceos ou peixes.

A proteína Cel1, expressa no eucalipto evento H421, não é tóxica e não tem similaridade com toxinas ou alérgenos conhecidos. Endoglucanases da mesma família da enzima 1,4- β -endoglucanase (Cel1), com alto grau de similaridade e identidade, estão presentes em diversos produtos significativos da alimentação animal e humana, sem histórico de efeitos adversos. A expressão desta endoglucanase específica não é significativa em relação à expressão de endoglucanases que ocorre em eucalipto convencional.

Somado ao fato de que o eucalipto não é uma planta alimentícia, o evento H421 não tem capacidade potencial de causar qualquer efeito adverso ao consumidor, humano ou animal.

9. As avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas em animais experimentais, descrevendo os resultados.

Uma parte que integra o processo de desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas é a avaliação sobre as proteínas que podem ser expressas nessas culturas, verificando se elas não são estrutural ou funcionalmente relacionadas com proteínas conhecidas por causar efeitos adversos no trato gastrointestinal e na função imune, assim como proteínas conhecidas como tóxicas ou farmacologicamente ativas em mamíferos, incluindo os humanos. A proteína Cel1, por exemplo, passou por essas avaliações e homologias com proteínas alergênicas, toxinas ou farmacologicamente ativas não foram identificadas. Portanto, não há justificativa científica para avaliar essa proteína quanto a possíveis efeitos farmacológicos, já que ela não possui essa atividade. Os estudos de bioinformática demonstram a ausência de similaridade de sequências dessa nova proteína com proteínas tóxicas, alergênicas ou atividade farmacológica e completam a avaliação de segurança que também inclui os ensaios de toxicidade aguda realizados com minhocas, microcrustáceos, peixes e microrganismos, conforme mencionado



anteriormente e apresentados como parte da resposta ao **Item n. 3 – Parte VII**, localizada adiante no presente documento.

A avaliação do potencial de toxicidade das proteínas Cel1 e NPTII no evento H421 foi baseada na premissa de que uma proteína não é tóxica se:

- Possuir histórico de uso seguro;
- Não houver similaridade estrutural com toxinas conhecidas ou outras proteínas biologicamente ativas que podem causar efeitos adversos em humanos ou animais;
- Não exercer nenhum efeito tóxico agudo a outros organismos.

Adicionalmente, a baixa concentração das proteínas heterólogas (**Parte V – Item n. 10**) para a expressão das proteínas Cel1 e NPTII no evento H421 nos tecidos das plantas fornece uma certeza adicional sobre sua segurança.

9.1. Similaridade estrutural da proteína Cel1 com toxinas conhecidas ou outras proteínas biologicamente ativas.

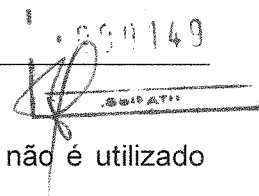
A avaliação de segurança das proteínas expressas nas culturas derivadas da biotecnologia analisa o potencial para efeitos à saúde através de uma abordagem abrangente, a qual inclui a análise de bioinformática da sequência de aminoácidos das proteínas expressas para assegurar que elas não são similares a proteínas conhecidas por causar efeitos adversos à saúde.

A ferramenta de alinhamento de sequência FASTA foi utilizada para avaliar a similaridade estrutural. Embora o programa FASTA compare diretamente as sequências de aminoácidos (isto é, a estrutura primária da proteína), os dados de alinhamento podem ser utilizados para inferir sobre as similaridades das estruturas secundária e terciária da proteína. Proteínas que compartilham de um alto grau de similaridade em todo o seu comprimento são frequentemente homólogas, e compartilham da estrutura secundária e da configuração tridimensional comum.

As similaridades estruturais entre a sequência da proteína Cel1 e as sequências de toxinas depositadas em bancos de dados e de domínio público (TOXIN5; ALLPEPTÍDEOS) foram examinadas. A extensão de cada similaridade foi avaliada através de inspeção visual do alinhamento, o percentual de identidade calculado e o valor *E*-score (*score* esperado) para o alinhamento. O *E*-score é uma medida estatística da probabilidade de que uma similaridade observada tenha ocorrido por chance em uma busca. Um *E*-score maior indica um menor grau de similaridade entre a sequência em questão e a sequência do banco de dados. Tipicamente, alinhamentos entre duas sequências precisarão de um *E*-score de 1×10^{-5} ou menor para serem considerados de potencial homologia significativa na sequência. Os resultados mostraram que não há similaridade estrutural biologicamente relevante da sequência da proteína Cel1 com toxinas que causam efeitos adversos em humanos e animais.

9.2. Exposição à proteína Cel1

A proteína Cel1 está presente em baixos níveis na planta, representa menos que 0,35 % da proteína total das folhas no eucalipto evento H421. Esses resultados sugerem que não existem riscos significativos à saúde humana e animal originados



pela exposição à proteína Cel1 na dieta, mesmo porque o eucalipto não é utilizado diretamente na alimentação humana ou animal.

9.3. Exposição à proteína NPTII.

A proteína NPTII está presente em baixíssimos níveis na planta, representando menos do que 0,003 % da proteína total nos tecidos do eucalipto evento H421. Esses resultados, aliados ao fato de que o eucalipto não é diretamente utilizado na alimentação, sugerem que não existem riscos significativos à saúde humana e animal originados da exposição à proteína NPTII na dieta.

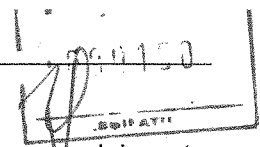
9.4. Conclusões sobre o potencial de toxicidade das proteínas Cel1 e NPTII.

As proteínas Cel1 e NPTII foram avaliadas quanto ao seu potencial para toxicidade a humanos e animais de acordo com recomendações da *Codex Alimentarius Commission* (Codex, 2003). O primeiro ponto a se destacar em relação ao potencial de toxicidade se refere ao fato do eucalipto não ser essencialmente uma planta alimentícia, não fazendo parte da dieta humana ou animal. As proteínas expressas no evento H421 apresentam ausência de similaridade estrutural com toxinas conhecidas ou proteínas biologicamente ativas que causam efeitos em mamíferos e não causam toxicidade oral aguda relatada em organismos indicadores. Endoglucanases com alta identidade e similaridade com a Cel1 estão presentes em alimentos consumidos por humanos e animais de forma crua ou processada, além de constituírem uma porção muito pequena da proteína total presente em tecidos do eucalipto evento H421. Cel1 e NPTII são proteínas derivadas de *A. thaliana* e de *E. coli*, respectivamente, organismos que vêm sendo utilizados comercialmente ou estão em contato com o ambiente há mais de 40 anos para compor produtos microbianos usados na agricultura e na medicina. Os resultados dos estudos de toxicidade aguda com organismos indicadores realizados com os tecidos de eucalipto H421 corroboram os demais resultados sobre sua segurança. Finalmente, as proteínas Cel1 e NPTII representam não mais de 0,35 % e 0,003 % das proteínas totais extraídas dos tecidos de eucalipto evento H421, respectivamente. Esses dados, considerados em conjunto, levam à conclusão de que é bastante improvável e inesperado que as proteínas expressas no eucalipto H421 causem qualquer efeito tóxico em humanos e animais. Avaliações de vigilância farmacológica não são pertinentes para as proteínas Cel1 e NPTII, pois o eucalipto evento H421 não é um produto para uso farmacológico.

10. A similaridade dos produtos de expressão do OGM com alérgenos conhecidos, relatando possíveis reações alérgicas identificadas após ingestão do OGM nas avaliações em animais experimentais, descrevendo os resultados.

Atualmente é cada vez maior a utilização de plantas modificadas geneticamente (transgênicas), nos ramos alimentício e industrial. Estas modificações genéticas geralmente levam à introdução de novos genes, o que dá origem a indagações sobre as propriedades alergênicas e tóxicas que as novas plantas poderão apresentar.

EM BRANCO



Uma atividade importante e que faz parte do processo inicial de desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas é a avaliação sobre as proteínas que podem ser expressas nessas culturas, verificando se elas não são estrutural ou funcionalmente relacionadas com proteínas conhecidas por causar efeitos adversos no trato gastrointestinal e na função imune, assim como proteínas conhecidas como tóxicas ou farmacologicamente ativas em mamíferos, incluindo os humanos.

Desta forma, foi realizada análise bioinformática, *in silico*, com o objetivo de verificar o potencial alergênico e a toxicidade de uma construção transgênica a ser inserida em eucalipto. A análise envolveu ambos os genes presentes na construção, a saber, o gene seletor *nptII* e o gene principal *cel1* de *Arabidopsis thaliana*.

O foco da análise foi a comparação das sequências da construção com sequências alergênicas e toxinas conhecidas, 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 organizou em três aspectos principais: seleção do banco de dados, escolha da ferramenta de análise, e determinação dos critérios a serem utilizados na análise. A partir dos bancos de dados selecionados, e com os critérios de análise utilizados, com base na literatura, não foram encontrados indícios de que as proteínas transgênicas possuam semelhança com outrasque sejam alergênicas ou tóxicas.

As proteínas Cel1 e NPTII passaram por essas avaliações e homologias com proteínas alergênicas, toxinas ou farmacologicamente ativas não foram identificadas. Portanto, não há justificativa científica para avaliar essas proteínas quanto a possíveis efeitos farmacológicos, já que elas não possuem essa atividade. Os estudos de bioinformática demonstram a ausência de similaridade de sequências dessas proteínas com proteínas tóxicas, alergênicas ou atividade farmacológica, e completam a avaliação de segurança que também inclui os estudos de toxicidade oral aguda, conforme mencionado anteriormente. Quanto à alergenicidade, nenhum modelo animal pode prever alergenicidade humana de maneira acurada e, assim, nenhum modelo foi validado até o momento. A comissão do *Codex Alimentarius* (CODEX, 2003) publicou um conjunto de regras para avaliação do potencial alergênico de novas proteínas. As informações necessárias, do ponto de vista de alergenicidade, para a avaliação da segurança de alimentos derivados de plantas geneticamente modificadas, segundo esse relatório, são: 1- a fonte do gene (se proveniente de organismo alergênico ou não); 2- a similaridade da proteína de interesse com alérgenos conhecidos; 3- a estabilidade da proteína de interesse à digestão *in vitro* (se é ou não estável em fluidos simulados - gástrico e intestinal); 4- o nível de expressão da proteína de interesse; 5- os estudos de ligação de IgE, se apropriados (esses estudos são realizados apenas se a sequência do gene de interesse é proveniente de um organismo alergênico ou a sequência da proteína expressa tiver homologia significativa com uma proteína alergênica, o que não é o caso dos genes *cel1* e *neo*).

Em virtude destes questionamentos, torna-se importante avaliar o potencial alergênico e de toxicidade de uma planta transgênica, estudando os genes introduzidos ou modificados. No entanto, ainda não há consenso sobre uma metodologia 100 % segura de avaliação deste tipo de planta, ou de seus genes. Existem comissões como a Codex Alimentarius Commission das Nações Unidas, ou o

EM BRANCO



European Food Safety Authority (EFSA), da União Européia, que criaram guias e normas para tentar estabelecer métricas de aceitação para este tipo de alimento, assim como para avaliá-los; mas não possuem uma aceitação completa. Pesquisas auxiliadas por métodos de bioinformática têm sido realizadas no intuito de examinar o potencial alergênico e de toxicidade de uma determinada planta, através da análise dos genes alterados.

Goodman (2006) apresenta métodos para identificação de igualdades potenciais entre proteínas; em outro trabalho (Goodman & Tetteh, 2011) comenta que três passos são fundamentais para realização de uma boa análise de bioinformática, para buscar similaridades entre a sequência (gene) modificado e outras previamente conhecidas como nocivas, alergênicas. As três etapas são:

- escolha por um banco de dados bem curado com as sequências previamente conhecidas,
- seleção de ferramentas de alinhamento confiável, e
- determinação de critérios de análise, em especial os de corte para distinguir entre uma sequência ser de fato similar a outra, ou não.

Desta forma, esta foi a estratégia seguida no trabalho de busca.

Foram selecionados três banco de dados, amplamente conhecidos e utilizados na literatura: do AllergenOnline (<http://www.allergenonline.org>), o banco Não-Redundante (NR) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Sayers *et al.*, 2009) e UniProt (The UniProt Consortium, 2011). O banco de dados do AllergenOnline, em sua 13ª versão, conta com 1630 sequências de proteínas revisadas e classificadas como alergênicas, incluindo seus gene id's (GI) de identificação no NCBI.

Do banco de dados de proteínas do NCBI foram extraídos quatro subconjuntos de sequências, um deles realizando uma busca por proteínas com a palavra allergen, outro com a palavra antigen, o terceiro toxin, e o quarto e último toxic. Foram encontradas 41408 sequências de proteínas allergen, e com elas foi criado um banco de dados. Com relação às sequências de proteínas antigen, foram encontradas 303986 e com elas foi criado um outro banco de dados. O banco toxin foi construído com 330.547 proteínas e o toxic com 227.311.

Para o banco UniProt repetiu-se o processo do NCBI, extraíndo quatro subconjuntos de sequências: o banco de sequências allergen do UniProt foi montado com 15.082 proteínas; enquanto o banco de antigen foi montado com 1.873 proteínas. O banco toxin foi construído com 7.416 proteínas e o toxic com 4.367.

Desta forma, foram totalizados nove banco de dados, o do AllergenOnline, com sequências de allergen, antigen, toxin e toxic; NCBI e UniProt, dois bancos (allergen e antigen) para cada um deles. Todos os bancos foram acessados em 16/09/2013, e, portanto, esta informação com relação à quantidade de sequências corresponde a esta data.

Para utilização das sequências do NCBI e do UniProt como banco de dados, foi preciso prepará-las através do programa **formatdb** disponibilizado pela ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Para cada um dos oito bancos de dados, após a busca pelas sequências, foi realizado download das mesmas em um arquivo FASTA (um para cada pesquisa/banco de dados). Finalmente, cada um dos oito arquivos foi submetido ao programa **formatdb** que os formatou como bancos de dados para busca.

1.000.000/152
 [Stamp]

A seleção de qual ferramenta a ser utilizada variou de acordo com o banco de dados. Duas foram utilizadas: o FASTA (Pearson & Lipman, 1988) e o BLAST. O AllergenOnline utiliza como ferramenta de alinhamento o software FASTA, por se tratar de uma aplicação web; ou seja, sequências e ferramentas de alinhamento são definidas pela aplicação e executadas no site remoto. A ferramenta BLAST, mais especificamente a BLASTP, específica para o alinhamento de proteínas, foi utilizada nos alinhamentos das sequências oriundas do NCBI e do UniProt (8 outros bancos de dados formatados pelo FORMATDB). A versão utilizada foi a 2.2.25, de 03/03/2102.

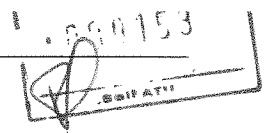
A definição dos critérios de análise, especialmente dos critérios de tamanho e identidade de alinhamentos que podem ser considerados como válidos, ou seja, que de fato representam similaridade entre as sequências a ponto de se suspeitar de uma cross-reactivity foi realizado com base na literatura. Diferentes trabalhos relatam que um critério razoável quando se utilizam os programas FASTA ou BLASTP nos alinhamentos é de 35% de identidade e alinhamentos com no mínimo 80 aminoácidos [Goodman & Tetteh, 2011; Zhou *et al.*, 2013].

Embora existam comentários de que o limite de 35 % possa levar a identificação de falsos positivos e deva ser elevado para 50 %, foram mantidos os 35 % como critério de separação entre alinhamentos válidos ou não. Esta decisão é conservadora, pois é preferível aumentar a chance de detectar falsos positivos a correr o risco de deixar passar despercebido algum alinhamento importante próximo à zona limite.

A sequência denominada Cel1 (492 aminoácidos), de um dos genes introduzidos no eucalipto evento H421 foi comparada com cada um dos 9 bancos de dados descritos na Seção 2.1, utilizando as ferramentas selecionadas na Seção 2.2. Desta forma, levando em conta que se tem duas sequências proteicas de interesse, Cel1 e NPTII, foram realizadas as comparações listadas na **Tabela VI.8**.

Tabela VI.8. Comparações efetuadas envolvendo uma sequência de interesse, um banco de dados e uma ferramenta de comparação.

Sequência	Fonte	Ferramenta	Comparação
Cel1	AllergenOnline	FASTA	<i>Cel1_X_AllergenOnline</i>
	NCBI	BLASTP	<i>Cel1_X_allergenNCBI</i>
			<i>Cel1_X_antigenNCBI</i>
			<i>Cel1_X_toxinNCBI</i>
			<i>Cel1_X_toxicNCBI</i>
	UniProt	BLASTP	<i>Cel1_X_allergenUniProt</i>
		<i>Cel1_X_antigenUniProt</i>	
		<i>Cel1_X_toxinUniProt</i>	
		<i>Cel1_X_toxicUniProt</i>	
NptII	AllergenOnline	FASTA	<i>NptII_X_AllergenOnline</i>
	NCBI	BLASTP	<i>NptII_X_allergenNCBI</i>
			<i>NptII_X_antigenNCBI</i>
			<i>NptII_X_toxinNCBI</i>
			<i>NptII_X_toxicNCBI</i>
	UniProt	BLASTP	<i>NptII_X_allergenUniProt</i>
		<i>NptII_X_antigenUniProt</i>	
		<i>NptII_X_toxinUniProt</i>	
		<i>NptII_X_toxicUniProt</i>	



A comparação Cel1_X_AllergenOnline de Cel1 com o banco AllergenOnline resultou no alinhamento com duas sequências. Uma delas é um alergênico (gi|13959403|sp|Q01940.1|MALF1_MALFU RecName: Full=Major allergen Mal f 1) e a outra é um antígeno (gi|289742483|gb|ADD19989.1| salivary antigen 5 precursor variant).

Apesar dos dois alinhamentos retornados contra o AllergenOnline, nenhum deles foi significativo com relação aos critérios adotados; o alinhamento com a sequência alergênica, apesar de englobar 93 aminoácidos, teve identidade de apenas 26 %; o alinhamento com o antígeno teve identidade de 22 %, apesar de seus 159 aminoácidos. Ainda, é importante comentar que, apesar de não haver muitos gaps nestes alinhamentos, aconteceram poucos matches também, predominando assim os mismatches (substituições).

As comparações de Cel1 com os bancos de *allergen* e de *antigen* do NCBI também não obtiveram alinhamentos dentro dos critérios esperados. O melhor alinhamento de Cel1_X_allergenNCBI foi com a proteína "ref|YP_003506626.1|alkyl hydroperoxide reductase [*Meiothermus ruber* DSM 1279]". Apesar de alcançar os 34 % de identidade, próximo aos critérios de validação, o tamanho do alinhamento foi pequeno, com apenas 48 aminoácidos.

Na comparação Cel1_X_antigenNCBI, pode-se citar como exemplo o alinhamento com " gb|AFC23205.1| surface antigen variable number repeat protein [*Sapropira grandis* str. Lewin]", de 32 % de identidade, mas com apenas 52 aminoácidos. Foi possível perceber ainda que, nas comparações com ambos os bancos de dados, outras sequências que apareceram alinhadas com Cel1 coincidiram no mesmo trecho: posições de 430 a 478 de Cel1 para *allergen*, e posições de 432 a 484 de Cel1 para *antigen*.

Os resultados das comparações com os bancos derivados do UniProt (*allergen* ou *antigen*), revelaram alguns hits significativos, porém não com domínios alergênicos. Na comparação Cel1_X_allergenUniProt, apareceram dois resultados significativos segundo os parâmetros previamente definidos, e dois outros muito próximos de serem significativos. O melhor deles foi com uma sequência não revisada, correspondente a um scaffold da montagem de *Oikopleura dioica*. O alinhamento cobriu uma região de mais de 400 aminoácidos e apresentou identidade de 35 %, o que o coloca como significativo segundo nossos critérios. Porém, ao analisar a razão desta proteína, identificada como E4Y521, ter sido incluída no banco de alergênicos do UniProt, observamos que ela contém um domínio DPBB (Brawin-like Double Psi Beta-Barrel), código IPR007112 no InterPro, que existe também em potentes alergênicos ambientais, tais como partículas de pólen. Contudo, o alinhamento entre Cel1 e E4Y521 ocorre na região entre os aminoácidos 271 e 714 de E4Y521, enquanto que o domínio DPBB, do alergênico de pólen, alinha-se entre 762 e 840 de E4Y521. Ou seja, não existe intersecção entre estas regiões, e podemos portanto descartar a inferência de alergenicidade para Cel1 a partir deste alinhamento.

Há outros três alinhamentos em condições semelhantes. Todos eles são com sequências que contêm o domínio DPBB, mas os alinhamentos com Cel1 são fora destas regiões, como mostra a **Tabela VI.9**.

Tabela VI.9. Alinhamentos de Cel1 contra sequências com domínio DPBB, potencialmente alergênico.

Sequência UniProt	Alinhamento Cel1	Alinhamento DPBB	Intersecção
E4Y521	271-714	762-840	VAZIA
E4XD95	317-760	808-886	VAZIA
E4XG49	320-744	1027-1044	VAZIA
E4YEM9	321-744	1027-1044	VAZIA

Já na comparação Cel1_X_antigenUniProt, a única sequência que alinhou com Cel1 é uma variação da alinhada no NCBI, mas não revisada, e a região de alinhamento é a mesma, entre as posições 432 a 484.

Notou-se que as sequências encontradas como similares a Cel1 no AllergenOnline, apesar de estarem presentes nos respectivos bancos (*allergen* e *antigen*) do NCBI, sequer apareceram, mesmo que com baixa pontuações nos alinhamentos resultantes.

Foi observado que, por padrão, o BLASTP utiliza em seus alinhamentos a matriz de substituição BLOSUM60, enquanto que a ferramenta FASTA utiliza a BLOSUM50 (Henikoff & Henikoff, 1992). Na tentativa de verificar se elas apareceriam caso a matriz de substituição fosse alterada, executou-se o BLASTP novamente, para ambos os bancos do NCBI (resultados não mostrados), mas elas não foram exibidas nos alinhamentos.

Com respeito aos bancos *toxin* e *toxic* do NCBI (que correspondem às comparações Cel1_X_toxinNCBI e Cel1_X_toxicNCBI), não foram encontrados alinhamentos reportáveis pelo BLAST.

As comparações com toxinas do banco UniProt obtiveram os seguintes alinhamentos: em Cel1_X_toxinUniProt foram encontrados hits com duas proteínas: "sp|Q21432|NAS11_CAEEL Zinc metalloproteinase nas-11 OS= *Caenorhabditis elegans* GN=nas-11" e "sp|P45784|GSPN_VIBCH Type II secretion system protein NOS = *Vibrio cholerae* serotype O1". O primeiro deles, apesar de 40 % de identidade, possui apenas 31 aminoácidos. O segundo é maior, com 104 aminoácidos, mas identidade de apenas 26 % e com vários gaps no alinhamento. Na comparação Cel1_X_toxicUniProt não ocorreu nenhum hit.

Na comparação NptII_X_AllergenOnline de NPTII com o banco AllergenOnline nenhum alinhamento reportável foi encontrado. Com respeito aos bancos do NCBI, *allergen* e *antigen*, apesar de alguns alinhamentos terem sido encontrados, não se mostraram significativos.

No caso do banco *allergen*NCBI, houve um alinhamento com a proteína "ref|YP_004826121.1| pectate lyase / Amb allergen [*Rhodothermus marinus* SG0.5JP17-172]", mas de um pequeno trecho de apenas 44 aminoácidos e 28 % de identidade. Com o banco *antigen* não foram encontrados hits.

Para os bancos do Uniprot, o *antigen* não originou qualquer hit; já no *allergen*, apenas dois pequenos trechos de cerca de 30 aminoácidos de proteínas não revisadas mostraram-se semelhantes, mas que não podem ser considerados significativos, por não atenderem aos critérios de significância propostos neste estudo.

Os resultados de análise de toxicidade também não mostraram alinhamentos relevantes. Nas comparações com os bancos provenientes do NCBI,

EM BRANCO



NptII_X_toxinNCBI e NptII_X_toxicNCBI, não foram encontrados hits com qualquer proteína.

Para Uniprot, NptII_X_toxinUniProt teve o alinhamento com a sequência proteica “sp|B2BS84|IVBI_AUSLA Protease inhibitor OS = *Austrelaps labialis* PE=2 SV=1” de tamanho 24, e com 29 % de identidade. Ainda alinhou com outra sequência, “sp|Q02989|LITA_LATTR Alpha-latroinsectotoxin-Lt1a (Fragment) OS=*Latrodectus*”. Apesar de mais de 40 % de identidade, o tamanho do alinhamento foi de apenas 19 aminoácidos; e finalmente teve hits com três variações da proteína “sp|Q7V5X3|PTLH_BORPE Type IV secretion system protein PtlH OS = *Bordetella pertussis*”, cujos alinhamentos revelaram apenas 20 aminoácidos com semelhança (identidade 42 %).

Os alinhamentos de Npt II_X_toxicUniProt foram apenas quatro, cujos tamanhos não passaram de 20 aminoácidos e as identidades também não alcançaram os critérios da análise para serem considerados satisfatórios.

Conclusão quanto à similaridade das proteínas com alérgenos e toxinas

Tendo em vista os alinhamentos realizados com as duas ferramentas utilizadas, FASTA e BLASTP; e com os nove bancos de dados selecionados (oriundos de três fontes: AllergenOnline, NCBI e UniProt), foi possível observar que não há semelhança significativa entre a sequência Cel1 e as dos bancos de dados. O mesmo pode ser dito para a sequência NPTII, o seletor.

Dos nove bancos de dados selecionados, cinco continham sequências alergênicas e quatro continham toxinas; desta forma, foi possível cobrir tanto o potencial alergênico quanto o de toxicidade da sequência principal, assim como do seletor.

Através das análises realizadas neste estudo, pode-se afirmar que, seguindo os critérios de 35 % de identidade e alinhamentos maiores que 80 aminoácidos como indicação para suspeitar de reação cruzada, Cel1 e NPTII não apresentaram potencial alergênico e de toxicidade.

Proporção da proteína Cel1 nos tecidos do eucalipto H421.

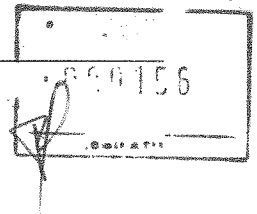
O nível médio de endoglucanases em tecidos do eucalipto H421 está entre 18,8 e 27,4 µg/g peso fresco de tecido, o que representa entre 0,23 e 0,35 % das proteínas extraídas pelo método utilizado para análise. A Cel1 representa parte do conjunto de endoglucanases.

Sabendo-se que a porcentagem média de proteína total em tecidos do eucalipto H421, determinada pelo método Kjeldhal é em torno de 14,14 % (ou 141.400,0 µg/g), a porcentagem máxima de endoglucanases no eucalipto H421 é calculada como se segue:

$$(0,0035 \times 0,1414 \text{ g/g}) \times 100 = 0,049 \%$$

Portanto, a enzima Cel1, que é uma das componentes das endoglucanases, representa uma porção muito pequena, abaixo de 0,049 % na composição total dos tecidos do eucalipto H421.

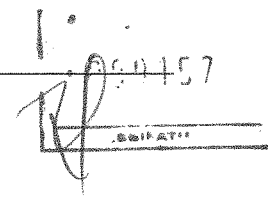
EM BRANCO



PARTE VII - AVALIAÇÃO DE RISCO AO MEIO AMBIENTE

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

EM BRANCO



AVALIAÇÃO DE RISCO AO MEIO AMBIENTE

(A) PLANTAS.

Informar:

- 1. A área de ocorrência natural do organismo parental do OGM, seus ancestrais e parentes silvestres – centros de origem e de diversidade genética – e espécies ancestrais ou parentes silvestres, existentes em algum ecossistema brasileiro, do mesmo gênero da espécie parental não-modificada.**

O *Eucalyptus grandis* ocorre naturalmente na Austrália, ao norte do Estado de New South Wales, ao sul de Queensland (próximo à região costeira e na parte central), e ao norte de Queensland em área de altitude (300 a 900 m). A precipitação pluviométrica varia de 1.000 a 1.700 mm, predominantemente no verão. Estação seca não ultrapassando três meses. Geadas ocasionais nas regiões mais interiores da área de ocorrência natural. Temperatura média das máximas do mês mais quente compreendida entre 29 a 32 °C, e a média das mínimas do mês mais frio entre 5 a 6 °C (FERREIRA, 1980).

Centro de Origem

O eucalipto é originário da Austrália, Ilhas de Timor, Ilhas de Flores, Papua Nova Guiné, fazendo destes países o centro de origem do gênero (Potts *et al.*, 2001), similar ao que o México é para o milho. Pertence à família das Myrtaceas e não existe nenhuma espécie nativa que seja compatível em cruzamentos. Andrade (1909) cita que havia no Rio Grande do Sul, árvores de eucaliptos com mais de 30 anos. Em 1904 a coleção inicial do Horto de Jundiaí possuía 73 espécies. Cada espécie era representada por cinco árvores, no mínimo, plantadas em diferentes condições de solo, umidade, altitude e exposição (Ferreira, 1997).

Centro de diversidade

O eucalipto é um recurso genético utilizado internacionalmente (Eldridge *et al.*, 1993). Praticamente todas as 800 ou mais espécies (incluindo *Eucalyptus*, *Corymbia* e *Angophora*; Hooper, 1997) são endêmicas para a Austrália e ilhas vizinhas. A Austrália tem a obrigação internacional para a gestão em longo prazo deste recurso genético nativo. O desenvolvimento de estratégias para gerenciar o material genético das principais espécies de eucalipto, visando minimizar os impactos da poluição genética, está entre os indicadores para o desenvolvimento sustentável na Austrália (Conselho Ministerial das Florestas 1997 p.14). A Colonização européia já teve um efeito substancial sobre a vegetação nativa da Austrália, Hooper (1997), por exemplo, observa que restam apenas 10% das extensas florestas temperadas da Austrália, que hoje são altamente fragmentadas. Atualmente, 74 espécies de eucaliptos são listadas como ameaçadas ou vulneráveis (Environment Australia, 2000). Esta questão é ainda mais acentuada (ver Gliddon, 1994) pela rápida expansão das plantações comerciais de eucalipto na Austrália nos últimos anos, com planos para triplicar o total

de plantações de 1 milhão de hectares para 3 milhões até o ano de 2020 (Conselho Ministerial das Florestas, 1997; Santos, 1999) (Potts *et al.*, 2001).

Eucalyptus globulus e *E. nitens* são as principais espécies de madeira cultivadas nas regiões temperadas da Austrália (Tibbits *et al.*, 1997). As plantações de *E. globulus* em particular estão aumentando rapidamente. Há também iniciativas de plantio em regiões subtropicais da Austrália com *E. grandis*, *E. pellita*, *E. pilularis*, *E. cloenziana*, *E. dunnii*, *Corymbia henryi* um *C. variegata* e vários híbridos artificiais (Nikles e Lee, 1998). Espécies como *E. cladocalyx*, *E. occidentalis*, *E. camaldulensis*, *E. tricarpa*, *Corymbia maculata*, *C. vaiegata* (Madeira e Arnold, 1999) e para óleo *E. kockii*, *E. e* *E. horistes polybractea* (Byrne e Macdonald, 2000) e vários híbridos (Harwood e Arnold, 1999) estão sendo desenvolvidas para o plantio nas zonas mais secas (400-600 mm/ano). Parte dessa expansão das plantações é movida por interesse em combater os efeitos deletérios da degradação do solo (plantios de restauração), tais como salinidade (Marcar *et al.*, 1995), e para acumular créditos de carbomo (Borough, 1998; O'Neill, 1999). No entanto, é importante considerar e minimizar os impactos deletérios sobre outros aspectos do ambiente (Mott, 1999). Esses impactos incluem mudanças na biodiversidade em floresta nativa adjacente, bem como a invasão mediada via sementes ou pólen da floresta nativa por espécies de plantações comerciais de eucalipto, que são bem conhecidos por sua propensão a hibridizar (Griffin *et al.*, 1988. Potts e Wiltshire, 1997) e é importante para avaliar o risco de introgressão de genes em florestas nativas (Byrne e Macdonald, 2000; Barbour *et al.* 2000; Jones *et al.*, 2000). A maioria das implantações florestais de eucalipto australianas foi efetuada nos últimos 10 anos e são atualmente aptas reprodutivamente. À medida que essas plantações atingem a maturidade reprodutiva, cresce o potencial para constituir uma importante fonte de pólen exótico que, por meio de dispersão e hibridização pode ter impacto sobre o pool genético florestal nativo. Os efeitos da hibridação foram também mostrados, podendo se estender além das espécies de árvores, para a composição e estrutura das comunidades de fungos e artrópodes dependentes de cultivos de eucaliptos (Whitham *et al.*, 1994; Whitham *et al.*, 1999). Esses impactos podem ainda fluir para os níveis tróficos superiores (Whitham *et al.* 1999). Assim, se houver um risco de poluição genética da floresta de eucalipto nativo, então isso pode ter consequências ambientais largas e não apreciadas (Potts *et al.* 2001).

Espécies ancestrais ou parentes silvestres

O Brasil não possui qualquer centro de diversidade do gênero *Eucalyptus* porque se trata de uma espécie exótica. O eucalipto não tem parentesco genético com qualquer espécie nativa para intercruzar no continente americano.

Uma das grandes vantagens competitivas representadas pelo cultivo do gênero *Eucalyptus*, reside no fato de ser exótico, não possuir até presente momento, predador ou parasita que cause grandes danos à cultura do eucalipto. Desta forma, poucos parasitas ou predadores desenvolveram interação ecológica com o eucalipto. Mesmo assim, podem ser relacionadas como agentes desfolhadores, formas jovens (larvas) de algumas espécies de insetos da ordem lepidóptera, forma adulta de algumas espécies da ordem Coleóptera e mais notadamente, formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, ordem Hymenóptera. Formas jovens de alguns coleópteros

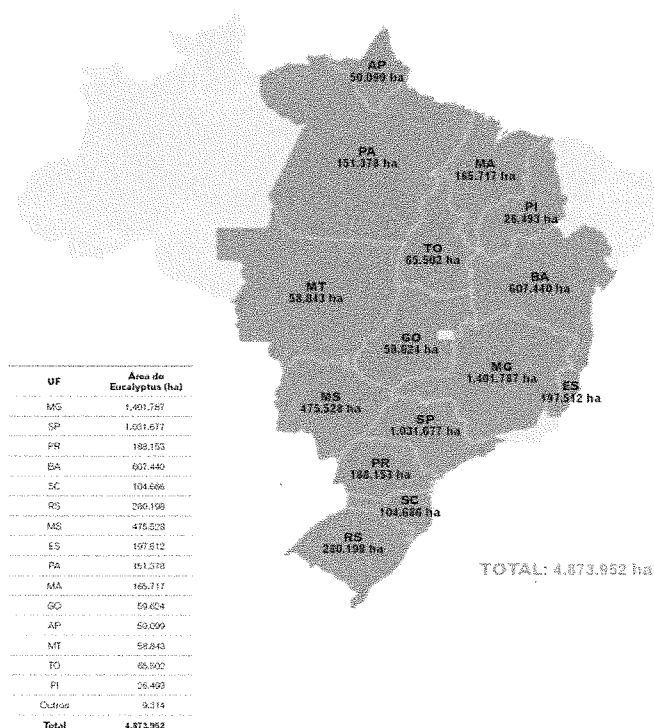
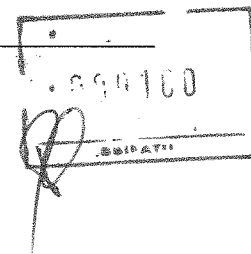
159
BIOFAT

atuam como broqueadores, causando injúrias físicas, que podem ser a via para a ação de patógenos oportunistas. É certa que a maioria destes agentes mantém forte interação ecológica com as Mirtáceas nativas, fato que facilitou sua adaptação ao gênero exótico.

2. A história de cultivo e de uso do organismo parental em termos de segurança para o meio ambiente, para o consumo humano e animal, informando sobre a possibilidade de hibridação introgressiva com as espécies sexualmente compatíveis e sobre a possível vantagem seletiva do transgene.

O gênero *Eucalyptus* inclui mais de 700 espécies, algumas das quais são as mais largamente utilizadas nos plantios madeireiros ao redor do mundo. São longevas, de folhas perenes, angiospermas pertencentes à família das Mirtáceas, as quais ocorrem predominantemente no hemisfério sul (Ladiges *et al.*, 2003). São nativos da Austrália e ilhas ao norte dela, ocorrem do nível do mar a altitudes alpinas, de zonas chuvosas a semiáridas e dos trópicos à latitude 43° sul (Ladiges *et al.*, 2003). Eucaliptos foram rapidamente adotados para o plantio florestal a partir da sua descoberta pelos europeus no século 18 (Eldridge *et al.*, 1993). Eles foram introduzidos na Índia, França, Chile, Brasil, África do Sul e Portugal no primeiro quarto dos anos 1800 (Doughty, 2000) e imediatamente selecionados para plantio, logo que tiveram percebidos seu grande desenvolvimento e adaptabilidade. Várias expedições para coleta de sementes se seguiram às primeiras introduções, resultando em uma grande distribuição de germoplasma pelo mundo todo. Hoje inúmeros países mantêm grandes e diversificadas coleções de germoplasma de eucalipto, que incluem uma ampla variedade de procedências para as espécies mais comumente plantadas (Grattapaglia e Kirst, 2008).

Em 2012, a área de plantio de eucalipto no Brasil totalizou 5.102.030 ha, representando crescimento de 4,5 % (228.078 ha) frente ao indicador de 2011. O principal fator que alavancou esse crescimento foi o estabelecimento de novos plantios frente à demanda futura dos projetos industriais do segmento de Papel e Celulose. A **Figura VII.1** mostra a área de eucalipto plantada em cada estado brasileiro, merecendo destaque os estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia. Os estados do Nordeste vêm apresentando grande crescimento anual de área plantada da cultura nos últimos anos.



Fonte: Associações Individuais e coletivas da ABRAS* (2012) e diversas fontes compiladas por Pólya Silviconsa® (2010).

Figura VII.1. Área plantada com eucalipto em cada estado do Brasil.

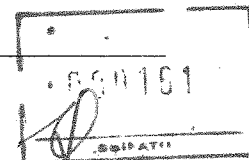
O gênero *Eucalyptus* é de ocorrência natural na Austrália e ilhas próximas e possui mais de 600 espécies, adaptadas as diversas condições de clima e solo. A maioria das árvores conhecidas são árvores típicas de florestas altas, com 30 a 50 metros de altura e de florestas abertas, com árvores de 10 a 25 metros de altura (ALZATE, 2004). Segundo Mora e Garcia, 2007 citados por ALZATE, 2004. As espécies de eucalipto mais utilizadas no mundo são o *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. viminalis*, *E. saligna*.

O *Eucalyptus grandis*.

O *E. grandis* Hill Ex Maiden é uma espécie nativa do Norte de Nova Gales do Sul e da costa sul de Queensland, na Austrália. Distribui-se principalmente entre as latitudes 26 a 32° Sul e altitudes 0 a 300 metros e se adapta muito bem a regiões com precipitações entre 1000 a 1750 mm e valores de temperatura médias máximas entre 29 e 32°C e médias mínimas entre 5 e 6°C. É uma das espécies mais versáteis e indicadas para usos múltiplos, apresentando, no entanto, problemas de empenamento, contrações e rachaduras nas operações de desdobro e secagem (ALZATE, 2004).

Esta espécie supera qualquer outra em incremento volumétrico em condições ambientais adequadas, sendo a mais plantada no Brasil, pela sua plasticidade genética e muito utilizada para na obtenção de híbridos e para a clonagem de árvores selecionadas, Mora & Garcia, 2000 citados por (ALZATE, 2004).

EM BRANCO



O Eucalyptus grandis X Eucalyptus urophylla.

O *E. urophylla* é uma espécie nativa de algumas ilhas orientais do Arquipélago de Sonda: Timor, Flores, Adonara, Lomblem, Plantar, Alor e Wetar, situadas ao norte da Austrália entre as latitudes 7 e 10° Sul.

O interesse pelo *E. urophylla*, surgiu no Brasil depois de comprovada sua alta resistência ao agente causador do cancro do tronco, sendo indicada na substituição ao *E. grandis* em áreas mais susceptíveis ao mesmo, sendo hoje o híbrido *E. grandis X E. urophylla* a base da silvicultura clonal brasileira.

Segundo Carvalho (2000), o objetivo do cruzamento destas duas espécies é obter plantas com um bom crescimento, característica do *E. grandis* e um leve aumento de densidade da madeira e melhorias no rendimento e propriedades físicas da celulose, característica do *E. urophylla*.

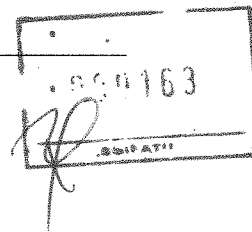
Segundo Gouvêa *et. al.* (1997), a rusticidade, propriedades da madeira e resistência ao déficit hídrico do *E. urophylla*, fazem com que as plantas desta espécie possuam alto potencial para programas de hibridação com *E. grandis*, que possui um bom desenvolvimento silvicultural, sendo possível obter material mais homogêneo e com qualidade da madeira desejáveis.

Usos Múltiplos

O Brasil é reconhecido não somente como um dos principais países, em termos de área de plantações florestais com espécies de eucaliptos com 5.102.030 milhões de hectares segundo a ABRAF, 2013 (evolução da área plantada na **Figura VII.2**), mas como detentor de elevado nível científico-tecnológico nas diversas áreas da eucaliptocultura, em função das pesquisas realizadas na Universidade, Institutos de Pesquisa e Empresas Florestais (ALZATE, 2004). Dentre as inúmeras e importantes áreas da pesquisa cabe destacar às de fisiologia, melhoramento genético e genômica florestal, proporcionando o domínio das técnicas de propagação vegetativa e de obtenção de híbridos, juntamente com a tecnologia da madeira, ampliando as possibilidades da utilização das árvores de eucaliptos.

A exemplo dos demais países, no Brasil, os novos materiais genéticos de espécies e híbridos, multiplicados pelo processo de clonagem, existentes em ensaios experimentais e em plantações comerciais, necessitam no desenvolvimento das etapas de pesquisa, serem analisados com relação aos parâmetros de qualidade da madeira. Nesse aspecto, ocorreu nas últimas décadas, a partir da experiência de outros países, como África do Sul (Malan & Hoon, 1992; Poynton, 1981 e Schonau, 1991) uma alteração com relação à utilização final da madeira, sendo introduzido um novo conceito denominado de “uso múltiplo da madeira” ou “uso da madeira para múltiplos fins” (Nahuz, 1995; Nahuz, 1997 e Nahuz *et al.*, 1998). Desta forma, além da utilização preferencial do tronco das árvores de eucaliptos como matéria prima para a celulose e papel que chega a 72,5% da produção Brasileira (ABRAF, 2013), conforme inicialmente concebidos os plantios, outras aplicações foram agregadas, como a fabricação de painéis de madeira industrializada (7,3%), energia (carvão 19,5%) e pellets. A **Figura VII.3** mostra os pontos principais da cadeia produtiva do eucalipto no Brasil.

EM BRANCO



Produção de Madeira para Celulose

Responsável pelo maior consumo de madeira de eucalipto do Brasil o setor de Papel e Celulose é responsável por 72,5 % de toda a área plantada com a cultura e também o setor que mais investe no melhoramento genético da espécie no Brasil.

Como descrito na **Figura VII.4**, a pesquisa e desenvolvimento florestal, através do melhoramento clássico, realiza cruzamentos e seleção de árvores superiores e disponibiliza novos materiais, adaptados as condições de plantio e com melhores características de produção (maior teor de celulose, processabilidade, menor teor de lignina, maior resistência a doenças, etc). As mudas são produzidas em viveiros de alta tecnologia e passam por um processo de rustificação antes de irem para as áreas de plantio. As mudas são plantadas em áreas próprias das empresas ou nas áreas de produtores rurais fomentados e nos meses seguintes ao plantio, é feito o controle de pragas (como formigas), além de adubações complementares e combate as plantas daninhas. Ao atingir cerca de 6 anos, os eucaliptos são colhidos dia e noite, segundo um planejamento prévio. A madeira é cortada e a folhagem e cascas são removidas ainda no campo e deixadas para incorporação ao solo, as toras são empilhadas à beira de estradas, dentro das fazendas e depois carregadas em caminhões, que levam as toras até as fábricas ou depósitos. Ao chegar as fábricas, a madeira é picada e reduzida a cavacos, que são cozidos cozidas a 150 °C em presença de álcali (Pasquali, 2007). Desse processo, é extraída a fibra da madeira que se transforma em celulose. O resíduo que sobra, chamado de licor negro, é queimado nas caldeiras de recuperação, gerando energia para alimentar a própria fábrica.

Estratégias sustentáveis

Em toda a produção da madeira são utilizadas técnicas visando minimizar o impacto no meio ambiente, como o monitoramento e redução do consumo de água no viveiro, monitoramento e controle de possíveis impactos nas microbacias, plantios em mosaico, intercalando áreas de mata nativa e os plantios de eucalipto, formando corredores ecológicos que facilitam o deslocamento de organismos entre fragmentos de matas nativas e áreas de conservação (SEOANE, *et al.* 2010), a. Adoção do cultivo mínimo, que não retira os resíduos da última colheita para que sirvam de adubo natural no próximo plantio, minimizando interferências no solo. Contratação de mão de obra local para as atividades de silvicultura. Realização do Programa de fomento. Inserindo produtores rurais no fornecimento de madeira. Investimentos em projetos de geração de renda local, como apicultura solidária e arranjos produtivos locais.

Mudanças Climáticas.

Como o plantio de eucalipto absorve CO₂, da atmosfera, o ciclo produtivo da cultura pode gerar créditos de carbono, contribuindo para combater o aquecimento global. O inventário de emissões de gases do efeito estufa (GEE) da Suzano Papel e Celulose (segunda maior produtora de celulose de eucalipto do mundo) apontou que para cada 1 tonelada de GEE que foram emitidas pela empresa 3,8 toneladas foram resgatadas (fonte: Relatório de Sustentabilidade Suzano Papel e Celulose, 2012).

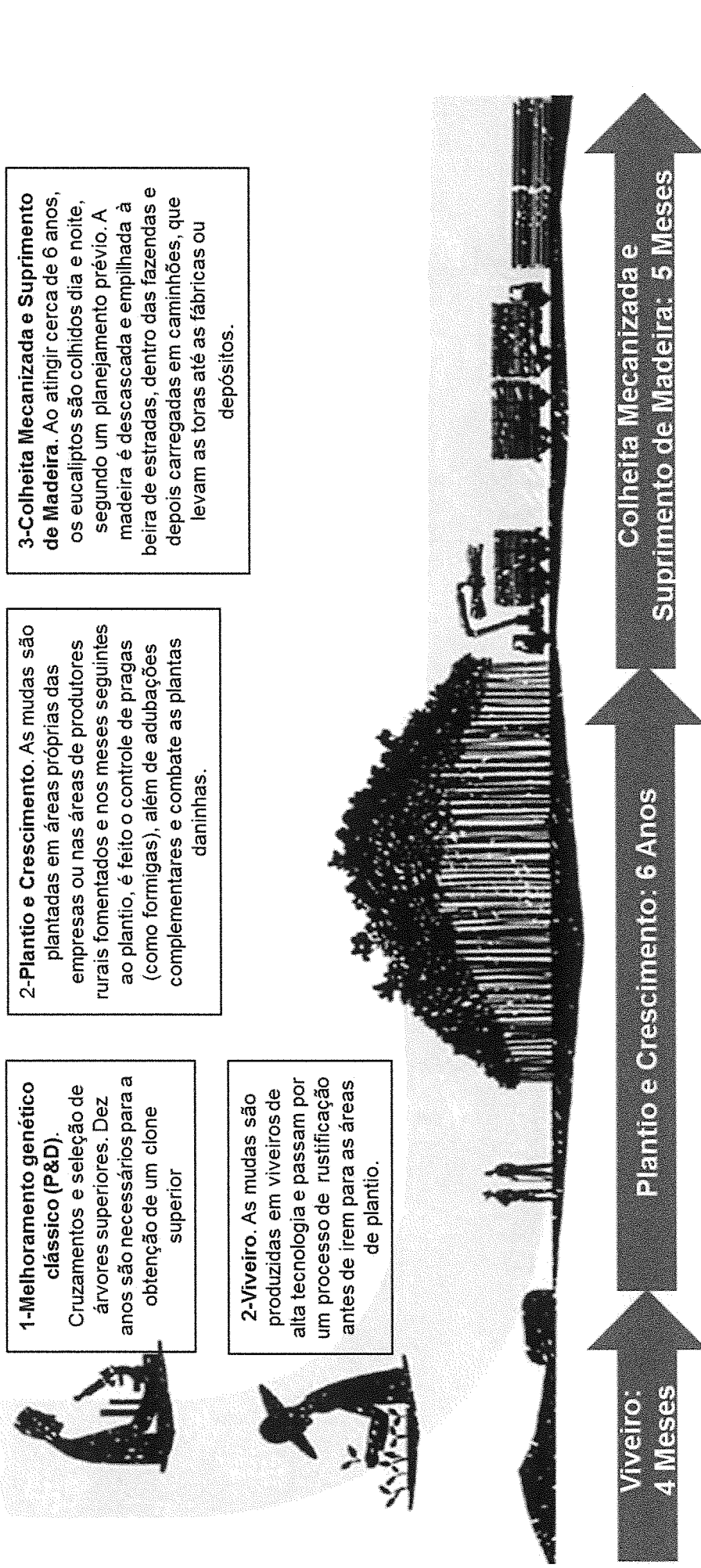
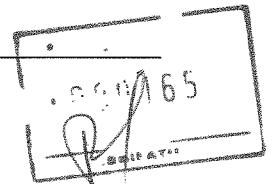


Figura VII.4. Processo de desenvolvimento e cultivo do eucalipto para celulose, desde a pesquisa à colheita e transporte até fábrica (adaptado do Relatório de Sustentabilidade da Suzano Papel e Celulose, 2012).

0004164
SUIPAT

EM BRANCO



Produção de *pellets* para geração de energia

A perspectiva do mercado de *pellets* no Brasil é promissora. A União Européia planeja que aproximadamente 20 % de toda a energia produzida no bloco seja proveniente de recursos renováveis até 2020. Em 2010, a produção mundial de *pellets* atingiu 16,0 milhões de toneladas, sendo a Europa responsável pela produção de 67 % desse total, seguida pela América do Norte, com 30% do volume total produzido. No Brasil, a produção de *pellets* ainda é modesta, registrando 47 mil toneladas em 2010. O uso de *pellets* pelo setor industrial é mais forte em países em que a produção de energia elétrica é baseada na queima de biomassa, como é o caso da Suécia, Dinamarca, Holanda, Bélgica e Reino Unido. Países como Alemanha, Itália e Áustria, bem como países da América do Norte, têm suas demandas focadas no aquecimento residencial. Em ambos os casos, mecanismos de incentivo têm sido importantes para o crescimento e direcionamento dessas demandas (ABRAF, 2013).

Atualmente existem projetos futuros de grande escala visando consolidar essa nova fronteira no Brasil (**Figura VII.5**). Com isso, a tendência é que o Brasil atenda a parte da demanda internacional produzindo 2 milhões de toneladas anuais de *pellets* (ABRAF, 2013).

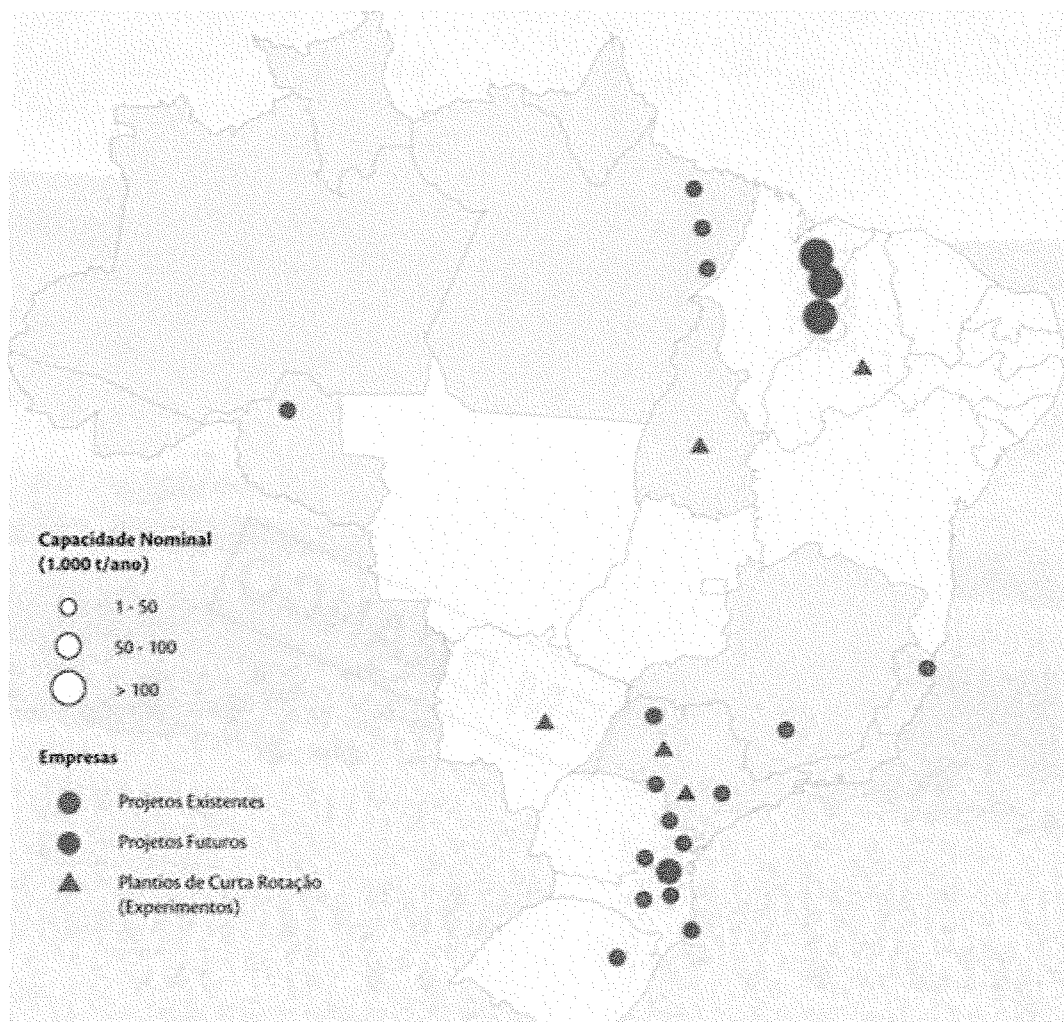
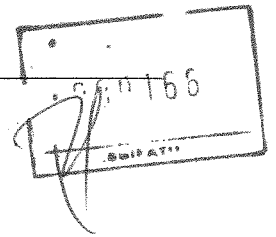


Figura VII.5. Mapa do setor de fabricação de *pellets* (ABRAF, 2013).

EM BRANCO



2.1 Hibridação

Importância da hibridação em plantas

A hibridação e introgressão são caracterizadas por ser mais comuns nas plantas do que em animais, com 70% da classificação de plantas geralmente citadas como potencialmente originárias da hibridação. A frequência de hibridização em gêneros de árvores está entre os mais elevados. Por exemplo, para as 23 espécies Britânicas de salgueiro (*Salix sp*), 123 combinações híbridas tem sido reportadas. Esta foi a maior proporção para os sete gêneros analisados na Grã-Bretanha. Híbridos interespecíficos naturais foram encontrados em 25 das 125 famílias de plantas representados na URSS; híbridos introgressivos foram descritos na maioria dos gêneros de árvores florestais incluindo abeto (*Picea*), larício (*Larix*), carvalho (*Quercus*), a bétula (*Betula*), tília (*Tilia*) e choupos (*Populus*). Há fracas barreiras reprodutivos entre as espécies (parentais) de árvores que as tornam particularmente vulneráveis à poluição genética. No entanto os ciclos reprodutivos são maiores, significando um tempo maior entre gerações, mas os problemas e riscos não são diferentes daqueles considerados para culturas com ciclos mais curtos. (Potts *et al.* 2001).

Hibridação em eucalipto

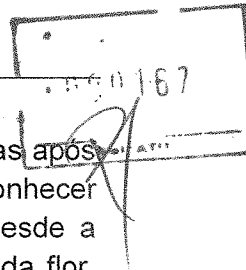
Hibridação natural e artificial em eucalipto foi revisada por Potts e Wiltshire (1997). Tal como acontece com muitos gêneros de árvores florestais, a hibridação entre as espécies reconhecidas é relativamente frequente (Wiltshire e Potts 1997), podem ocorrer híbridos singulares (i) ao longo dos limites da espécie, como indivíduos esporádicos, (ii) em enxames híbridos onde a hibridação foi ampliada para além da primeira geração, ou (iii), nas zonas de introgressão. Critérios pragmáticos para identificação de híbridos em populações naturais são dadas em Hooper *et al.* (1978):

“Na maioria dos casos, as características morfológicas e fisiológicas são herdadas de uma forma mais ou menos intermediário na primeira geração (F1), híbridos, embora haja exceções, uma vez que o grau exato de dominância pode variar entre espécies e características de combinações (Pilipenka et al 1969; Cauvin 1987; Tibbits et al 1991).”

Polinização

Espécies de eucalipto têm diferentes sistemas de cruzamento com altos níveis de cruzamento e polinização cruzada, na polinização aberta, que geralmente ocorre em pomares de produção de sementes a polinização é mediada pelos polinizadores, como aves, insetos e mamíferos (Potts *et al.*, 2001). A acessibilidade da flor de eucalipto aberta significa que os polinizadores geralmente não são específicos (Strauss, 2001). Nas condições brasileiras, o principal polinizador é a abelha *Apis mellifera*, conforme citado por PACHECO *et al.*, 1986.

As flores das espécies de eucaliptos apresentam protandria, onde o pólen é viável na antese e o estigma só atinge a receptividade alguns dias mais tarde. Para a



maioria das espécies a receptividade dos estigmas é alcançada entre 4 a 6 dias após a antese. Para outras entre 10 e 15 dias. Desta forma é necessário conhecer previamente, para as espécies a serem intercruzadas, o período que vai desde a antese até a receptividade máxima do estigma. Entretanto o simples exame da flor, por intermédio de uma lupa de mão, pode indicar se o estigma está ou não receptivo (ASSIS, 2013).

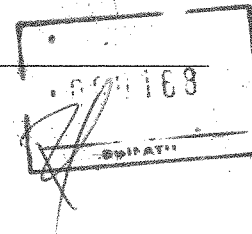
Dois métodos de polinização controlada são utilizados. Quando há coincidência entre os períodos de receptividade dos estigmas e de viabilidade do grão de pólen, nas espécies em que estes se soltam facilmente das anteras, a polinização é feita por meio da fricção direta destas sobre o estigma (polinização pela antera). Quando não há coincidência entre os períodos de receptividade do estigma e de viabilidade dos grãos de pólen, sendo necessário seu armazenamento, ou nas espécies em que há dificuldade de desprendimento dos grãos de pólen das anteras, sendo necessária sua coleta em dessecadores, a polinização é feita pela aplicação dos grãos de pólen sobre o estigma com o uso de instrumentos especiais. Estes instrumentos podem ser pincéis de pelo fino, cotonetes, palitos de fósforo ou até mesmo tórax de abelha. O importante é que sejam descartáveis ou então esterilizáveis para evitar contaminação quando houver substituição do pólen dos genótipos paternos (Assis, 2013).

Após a maturação dos frutos, estes são colhidos para extração e beneficiamento das sementes e testes dos híbridos produzidos (Assis, 2013).

Por esse método, Assis *et al.* (1986) sintetizaram 15 diferentes híbridos entre espécies do subgênero *Symphyomyrtus*, obtendo alta taxa de vingamento de frutos polinizados e com maior número de sementes por cápsula do que na polinização livre dentro das espécies. O método não foi tão eficiente para espécies do subgênero *Corymbia* e praticamente não funcionou nas espécies do subgênero *Monocalyptus*.

Cruzamento com espécies selvagens - Padrões e níveis de hibridação natural

O eucalipto é bem conhecido por suas fracas barreiras reprodutivas entre as várias espécies conhecidas (Pryor, 1976). Das 528 espécies examinadas em Griffin *et al.* (1988), 289 (55%) foram registradas como estando envolvida em pelo menos uma combinação híbrida natural. No entanto, em todo o gênero, a hibridação natural é, na verdade, considerada bastante restrita, com apenas 15% das combinações simpátricas (geograficamente coocorrência) registradas. No entanto, nas 883 espécies descritas listadas em Pryor e Johnson (1971), pelo menos 124 (14 %) são espécies, subespécies ou variantes posteriormente considerados como sendo de origem híbrida, e o número está aumentando (Rosseto *et al.*, 1997). A frequência de hibridação diminui amplamente com o aumento da distância taxonômica entre os pais (ou seja, inter-subgenérico < inter-seccional < inter-séries < intra-série) (Potts *et al.*, 2001). Este cenário é bem comum na Austrália e pode ocorrer também no Brasil, com o diferencial que o eucalipto é uma espécie exótica no país, sem parentais nativos sexualmente compatíveis, o que torna o potencial de risco de introgressão com população local, destinada a conservação, nulo.



Cruzamentos com espécies de Mirtáceas

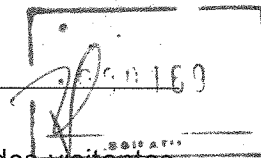
O Brasil não possui qualquer centro de diversidade do gênero *Eucalyptus*, porque se trata de uma espécie exótica no país. O eucalipto não tem parentesco genético com qualquer espécie nativa para inter cruzar no continente americano.

Segundo Grattapaglia *et al.* (2012) as Mirtáceas compreendem uma grande família com cerca de 5.650 espécies, distribuídas entre 130 e 150 gêneros, predominantemente na região tropical do hemisfério sul. São tipicamente diploides com tamanho do genoma variando de pequeno a médio (*Psidium guajava*, a goiabeira, $2n = 22$ cromossomos - 318 Mpb enquanto que em *Eucalyptus grandis* $2n = 22$ cromossomos - 640 Mpb). As mirtáceas exóticas como o eucalipto pertencem à tribo Eucalipteae, enquanto que as mirtáceas brasileiras pertencem à tribo Myrteae, onde a poliploidia foi relatada como uma importante fonte no processo de adaptação por da Costa *et al.* (2009).

Segundo Gressler *et al.* (2006), as mirtáceas brasileiras estão incluídas na Tribo Myrteae, representadas por aproximadamente 1.000 espécies, Myrtaceae é uma das famílias mais importantes do Brasil destacando-se, com mais de uma centena de espécies, os gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Calyptanthes*, enquanto o restante dos gêneros possui menos de 60 espécies brasileiras. Myrtaceae é uma das famílias lenhosas dominantes em várias formações vegetais brasileiras, especialmente na Floresta Atlântica onde mais de 50 espécies podem ocorrer. Geralmente não produzem madeiras valiosas, restringindo-se ao fornecimento de lenha, à utilização em pequenas peças ou objetos e outras formas de uso local. Por outro lado, há numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente (goiabeira – *Psidium guajava* L, a jabuticabeira – *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, e a pitangueira, *Eugenia uniflora* L.). A polinização por abelhas, com pólen como recurso principal, parece ser o sistema predominante, embora estudos detalhados tenham sido feitos para poucas espécies. Todas as espécies de *Myrtaceae* brasileiras possuem frutos carnosos cujo tamanho, cor, número e tamanho das sementes influenciam o processo de dispersão de suas sementes, sendo realizada principalmente por aves e macacos frugívoros.

As flores das mirtáceas brasileiras são hermafroditas, geralmente de cor branca, com estames numerosos, corola e cálice tetra ou pentâmeros e ovário ínfero. A estrutura geral das flores varia pouco entre as espécies quando comparada com outras grandes famílias. As pétalas e/ou os estames atuam como atrativos visuais aos polinizadores, mas os estames são, geralmente, as estruturas mais notáveis na flor aberta, envolvidos na atração visual e olfativa dos polinizadores (Gressler *et al.*, 2006).

O pólen é o principal recurso oferecido aos polinizadores, sendo o recurso primário pelo qual as abelhas, provavelmente o grupo mais importante de polinizadores de *Myrtaceae*, visitam as flores. São poucas as evidências de produção de néctar, observada em *Myrciaria dúbia*, *Psidium guajava*, *Eugenia spp* e *Plinia glomerata*, consistindo no principal recurso oferecido aos visitantes em espécies do gênero *Myrcianthes*. A abertura das flores ocorre usualmente no início da manhã (entre 4:00 e 6:00 h) e a flor dura, em geral apenas um dia. As abelhas nativas foram os polinizadores mais frequente em estudo descrito por Gressler *et al.* (2006), desconsiderando-se dos dados a polinização realizada por abelhas africanizadas (*Apis*



mellifera L.). Outros insetos (moscas, besouros e vespas) são considerados visitantes florais ou polinizadores ocasionais das mirtáceas. Para a goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) o principal polinizador são aves que tocam as flores ao se alimentarem de suas pétalas, embora os insetos presentes em menor número nas flores, também contribuam para a polinização. A polinização pelo vento é ainda incerta em mirtáceas americanas.

As aves formam o principal grupo dispersor das mirtáceas brasileiras, sendo seguidos pelos macacos (mamíferos), ambos se alimentam dos frutos carnosos das mirtáceas e dispersam as sementes através de suas fezes ou regurgitação (Gressler *et al.*, 2006).

Cruzamento das variedades cultivadas de *Eucalyptus* spp.

A liderança do Brasil na produção de produtos a partir da madeira do eucalipto se deve a grande adaptação da cultura às condições brasileiras. Todas as espécies utilizadas no Brasil hoje sejam elas puras ou híbridas, são provenientes do melhoramento clássico realizado pelas diversas empresas públicas ou privadas, ao longo de décadas de estudos. A produtividade que era de 15 metros cúbicos por hectare na década de 60 alcançou 40 metros cúbicos por hectare em 2012 (ABRAF, 2013). Os programas de melhoramento utilizam hoje métodos de polinização controlada, com coleta de pólen das variedades paternas e emasculação das variedades maternas, com fecundação por protogenia, em pomares de hibridação para uso exclusivo em cruzamentos.

As progênies destes cruzamentos são avaliadas em campos específicos para este fim, não se misturando à produção comercial para obtenção da madeira, para avaliação de parâmetros de crescimento, resistência a pragas e doenças, rendimento e qualidade da madeira.

A multiplicação de uma variedade selecionada se dá, primordialmente, a partir de técnicas de reprodução vegetativa, visando a obtenção de clones das plantas com bom desempenho na produtividade de celulose por área cultivada, com produção de mudas originadas de estacas colhidas em mini-jardins ou de plântulas desenvolvidas por meio de técnicas de cultura de tecidos. A utilização de pomares de sementes localizados próximos a campos de produção comercial não é um método largamente utilizado nos dias atuais para a obtenção de mudas no plantio de áreas de produção de madeira, devido à grande variabilidade e desuniformidade no fenótipo das árvores, que dificultam os tratamentos culturais, não permitem uma clara definição da melhor época para a colheita e um padrão nas dimensões e qualidade da madeira obtida.

Vantagem seletiva do transgene.

Nas avaliações de risco de dispersão dos novos genes inseridos (transferência gênica), são considerados tanto a probabilidade da ocorrência como o impacto adverso da ocorrência. As avaliações são específicas para cada caso e envolvem fatores bióticos da espécie em consideração, fatores abióticos e características do(s) gene(s) inserido(s). Os pontos essenciais dessa avaliação são as características reprodutivas da espécie em consideração, as características do ecossistema onde a planta será cultivada e a presença e abundância no ecossistema dos genes introduzidos na planta geneticamente modificada. As avaliações consideram também o

EM BRANCO



impacto da dispersão de gene(s) da cultura modificada para um organismo receptor. Caso essa dispersão venha a ocorrer, deve-se considerar se a transferência confere qualquer vantagem adaptativa ao organismo receptor que cause um desequilíbrio adverso no ecossistema (Nielsen *et al.*, 2000; Borém, 2001; Glover, 2002).

Na avaliação do risco associado à transferência dos genes *cel1* e *nptII* do eucalipto evento H421 para o eucalipto convencional, analisa-se o potencial de ocorrência da transferência de genes (exposição) e o efeito que essa transferência poderia acarretar (risco), ou seja, a consequência do fenômeno. Os principais fatores que afetam a transferência gênica entre as plantações são: a distância entre elas; o clima durante a polinização (temperatura, direção e velocidade do vento); e o grau de sincronia de florescimento dos indivíduos das plantações adjacentes no período de polinização. Assim sendo, duas plantas de eucalipto próximas uma da outra e com floração coincidente têm probabilidade de trocar genes por polinização cruzada, mas essa probabilidade diminui muito caso a distância aumente, devido à presença de barreiras naturais à transferência do pólen, como árvores, construções e outros obstáculos. O mesmo acontece tanto com o eucalipto H421 quanto com o eucalipto convencional. O potencial de dispersão da semente e a distância de movimentação do grão de pólen são fatores importantes nas considerações sobre transferência gênica, introgressão de genes e estabilidade da população de plantas com a nova característica. Normalmente a polinização cruzada ocorre, prioritariamente, entre as linhas adjacentes (bordadura), e a distância de cinco linhas é comumente utilizada como barreira para a contaminação por dispersão de pólen. Um eventual fluxo entre plantios pode ser dificultado pelo relevo ou pela estrutura da fazenda e vizinhanças (Bock *et al.*, 2002). Dada a forma de reprodução vegetativa, atualmente difundida na cultura do eucalipto, com o uso de clones, os impactos desta transferência não são relevantes. Adicionalmente, há que se considerar que os efeitos desta transferência, dada as atividades dos genes inseridos e as características conferidas às plantas, impactando tão somente no crescimento de suas células e maior produção de madeira, não representa dano potencial à cultura ou ao seu ambiente próximo.

Produção de mel

O eucalipto não pode ser considerado um alimento, pois a planta, ou partes dela, não está presente na dieta de animais e humanos de forma direta ou mesmo processada. No entanto, parte do mel produzido no Brasil apresenta como fonte o néctar e o pólen de plantações de eucalipto, dentre outras espécies que apresentam florescimento na mesma época.

A apicultura brasileira é caracterizada como uma atividade produtiva de baixo investimento, bom retorno financeiro e alta competitividade internacional. Atualmente, o Brasil é o 11º maior produtor de mel do mundo e o 5º maior exportador. Do volume total produzido anualmente (50 mil toneladas), aproximadamente 60 % é exportado. Em 2011, as exportações geraram uma receita de R\$ 118,3 milhões, representando um aumento de 77 % em relação ao ano anterior. Quanto ao destino das exportações, os Estados Unidos se destacaram como o maior consumidor do mel brasileiro, sendo o destino de 48 % das exportações nacionais do produto.

A produção de mel na área plantada com eucalipto geneticamente modificado, em época de florescimento, foi estabelecida para a realização de diversos estudos em laboratório que permitissem comparar o desenvolvimento dos enxames e a qualidade

EM BRANCO

do mel produzido com enxames e o mel produzido, na mesma época, em local plantado somente com eucalipto convencional.

Desta forma, foram instaladas cinco colmeias de abelhas do gênero *Apis* para produzir mel em condições de campo, tanto na área experimental plantada com eucalipto geneticamente modificado como em propriedade distante 85 km desta área, inteiramente plantada com eucalipto convencional, visando utilização do mel produzido em estudos de laboratório e análises subsequentes.

A instalação seguiu a orientação de produtor tradicional da região, que realizou o transporte das caixas com os enxames e acompanhou todos os procedimentos de manejo e coleta das amostras de mel. Foram indicados os locais mais adequados no campo, seguindo as normas de biossegurança, mas garantindo as condições ideais de iluminação, temperatura e outras condições climáticas para sobrevivência das populações de abelhas e produção de mel.

Para garantir a colheita da produção de mel em época adequada de florescimento do eucalipto, este foi monitorado mediante visitas semanais às áreas, em que, por avaliação visual, foi anotado o início, o pico e o final do florescimento das plantas de eucalipto. Desse modo foi possível identificar a melhor época de colheita do mel, posterior ao pico da floração, para assegurar a maior contribuição das flores de eucalipto geneticamente modificado em sua produção. Logo no início da floração as colmeias tiveram seus favos com mel retirados, para evitar as misturas com floradas de espécies presentes antes do período de floração do eucalipto. O mel de cada colmeia foi coletado separadamente, submetido à decantação para a separação das impurezas carregadas na sua extração, e então encaminhado ao acondicionamento final para a constituição das amostras.

De acordo com a extensão de objetivos relacionada ao processo CTNBio N° 01200.003375/2005-51 de Liberação Planejada no Meio Ambiente das plantas GM de eucalipto, as caixas contendo colméias de abelhas foram controladas e vistoriadas periodicamente. As caixas estavam dotadas de grades especiais em suas aberturas externas, de forma a impedir a saída de abelhas-rainha e zangões, evitando-se a formação de novos enxames. As caixas principais foram isoladas das sobrecaixas por grades/telas excludoras semelhantes, assegurando-se que, nestas últimas, fossem depositados apenas mel e própolis pelas abelhas-operárias, e não ovos pelas abelhas-rainhas. Este procedimento foi adotado para impedir a revoada de abelhas-rainhas e zangões quando da instalação ou remoção de sobrecaixas para as coletas de mel, abelhas-operárias e outros materiais inerentes.

Entre as avaliações realizadas estão a quantificação da proteína total e análises físico-químicas das amostras de mel, detecção das proteínas heterólogas do eucalipto geneticamente modificado no mel, quantificação e qualificação do pólen presente no mel e ensaio para determinar o impacto do uso deste mel na sobrevivência de abelhas *Apis* e nativas sem ferrão, imaturas e adultas, em laboratório.

Análises realizadas: Físico-químicas - Açúcares totais; Açúcares redutores; Açúcares não-redutores; Acidez (mEq/kg); Umidade; Sólidos insolúveis em água; Cinzas; Hidroximetilfurfural (quantitativo); Reação de Fiehe; Reação ao Lugol; Análise microbiológica. Outras análises: Proteína total; Contagem de pólen; Conteúdo de pólen GM – PCR; Concentração de proteína oriunda de eucalipto GM.

Os resultados das análises físico-químicas se encontram na **Tabela VII.1** (cópia da **Tabela VII.2**, na resposta ao **Item n. 3 – Parte VI** deste documento).

Tabela VII.1. Resultados médios das análises físico-químicas em amostras de mel produzidas em área experimental de eucalipto GM e eucalipto convencional (2013).

Análises Físico-químicas em mel						
Característica	Amostra					
	Média área H421	DP	Média Área Controle	DP	Intervalo	
Proteína Total (g/100g)	0,43	0,09	0,33	0,12	0,25	0,31
Açúcares Totais (g/100g)	72,34	1,90	70,45	2,30	73,84	77,50
Açúcares Redutores (g/100g)	75,73	2,15	73,36	1,96	73,99	76,39
Açúcares 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 de Fiehe	ausente	-	ausente	-	ausente	ausente
Reação de Lugol	ausente	-	ausente	-	ausente	ausente
Reação de 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

3. Os possíveis efeitos em organismos indicadores relevantes (simbiontes, predadores, polinizadores, parasitas ou competidores do OGM) nos ecossistemas onde se pretende efetuar o seu cultivo, em comparação com o organismo parental do OGM em um sistema de produção convencional.

3.1. Efeito do eucalipto geneticamente modificado evento H421 na diversidade de artrópodes

Como instrumentos de detecção de risco ambiental, as comunidades de invertebrados, incluindo os artrópodes são inseridas em pacotes de estudos de regulamentação para eventos transgênicos. Diversos estudos utilizaram os invertebrados como bioindicadores em cultivos de milho, algodão e soja geneticamente modificados, principalmente aqueles com características de tolerância a herbicidas e de resistência a insetos pragas (Saxena & Stotzky, 2001; Men *et al.*, 2003; Naranjo *et al.*, 2005; Raybold *et al.*, 2007; Romeis & Meissle, 2011).

O grau de modificação que uma área está sendo submetida pode ser avaliado através da fauna de artrópodes. De acordo com Maleque *et al.* 2009, diversos insetos, como besouros e moscas foram usados como medida de inferência sobre o tipo de manejo em ecossistemas florestais. Sendo considerado um parâmetro biológico, o uso da fauna de artrópodes da parte aérea e do solo do eucalipto pode ser usado como promissora ferramenta na análise de impacto ambiental.

As observações e estudos foram conduzidos nas Unidades Experimentais da FuturaGene Brasil Tecnologia Ltda. em Angatuba-SP; Araraquara-SP; Caravelas – BA

173

e Passagem Franca-PI, todas devidamente incluídas no Certificado de Qualidade em Biossegurança da empresa, com experimentos aprovados de acordo com as respectivas liberações planejadas no meio ambiente submetidas à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Os tratamentos estabelecidos nos experimentos se compunham do eucalipto geneticamente modificado evento H421, do clone controle convencional SP530 e de referências comerciais I e II, todos instalados em dois espaçamentos diferentes (na configuração para produção de madeira para energia e a para celulose), totalizando 8 tratamentos. As parcelas apresentavam oito linhas de plantio e o delineamento utilizado em cada experimento foi o de blocos inteiramente casualizados, com 3 repetições.

Os levantamentos e observações dos artrópodes nas áreas de eucalipto foram realizados entre 2012 e 2013, cobrindo todas as estações do ano em todos os locais (Tabela VII.2).

Tabela VII.2. Datas de coleta, épocas de avaliação e locais de amostragem, 2012/2013.

Locais	Época 1	Época 2	Época 3	Época 4
	(0MAI ¹)	(3,5MAI ¹)	(7,5MAI ¹)	(10,5MAI ¹)
Araraquara/SP (Faz. Fortaleza)	20/07/12	21/12/12	12/04/13	09/08/13
Angatuba/SP (Faz. Cabreúva)	13/07/12	10/01/13	16/04/13	15/08/13
Caravelas/BA (Faz. Chave de Ouro)	03/08/12	07/02/13	09/05/13	22/08/13
Passagem Franca/PI (Faz. Chapada)	11/09/12	11/08/12	24/01/13	23/05/13

¹MAI – Meses após a instalação das primeiras armadilhas/observações.

As coletas e observações foram direcionadas para a avaliação de populações e comunidades dos seguintes estratos das parcelas de eucalipto:

- solo,
- superfície do solo,
- serapilheira
- parte aérea.

Para tanto, foram utilizadas técnicas de coleta específicas para cada material (solo, serapilheira) e diferentes armadilhas (*pitfall*, adesivos amarelo, azul e verde), além de técnicas de coleta direta (batida de ramo em saco plástico, puçá) e observação, para cobrir o maior espectro de artrópodes visitantes das áreas de eucalipto. Cada método de coleta e observação será descrito adiante, com detalhes do desenho amostral, bem como os resultados apresentados e discutidos.

Artrópodes do Solo

As amostragens foram direcionadas para a área central de cada parcela, compreendendo as 4 linhas centrais e evitando as bordaduras de 4 metros do início e fim de cada linha. No processo de extração do solo foi retirada de cada parcela uma

amostra composta, constituída por 10 subamostras tomadas em zigue-zague, de 10 cm de diâmetro e 5 cm de profundidade, sob a projeção da copa das plantas.

As amostras foram enviadas para o laboratório especializado em identificação de artrópodes, evitando-se exceder 5 dias entre o momento de coleta e o início da extração da mesofauna do solo, no intuito de não causar mortalidade severa dos organismos. Do mesmo modo, o acondicionamento das amostras foi feito sob refrigeração (gelo convencional) para promover a manutenção da atividade metabólica da mesofauna.

No laboratório, 1,0 litro de solo foi destinado ao método Berlese-Tullgren modificado para a extração da mesofauna. Para tanto, o equipamento dispunha de lâmpadas incandescentes de 40 W, para emissão de luz e calor em um período de 72h. Contrário ao gradiente, os organismos que migraram ao funil para fugir da desidratação do solo promovida pelo calor das lâmpadas foram coletados em recipientes de polietileno contendo álcool a 70 % e glicerina a 5 %.

O material conservado em álcool foi classificado em diferentes táxons, por comparação com coleções de referências ou por meio de literatura. Na análise foram considerados somente os exemplares em estado adequado para a identificação, sendo que larvas e partes isoladas do corpo de insetos foram desconsideradas. Exemplares foram mantidos em coleção de referência visando identificação por especialistas, se necessário.

Os táxons encontrados foram submetidos a análise de variância e as médias obtidas foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para atender as pressuposições básicas da análise de variância os dados foram transformados em raiz de $X + 1$.

As comunidades foram comparadas através do índice de diversidade de Shannon que leva em consideração a abundância proporcional de espécies, sendo o mais empregado devido a facilidade de cálculo, comparação entre variáveis, tendo assim, ampla aplicação (Semensatto, Jr 2003) De acordo com Ricklefs (1990), o uso da diversidade, principalmente de espécies, pode ser aplicado como uma indicação do bem estar de um ecossistema. Diversos estudos utilizaram o índice de Shannon como parâmetro para medir efeitos do tipo de manejo sobre a fauna de artrópodes (Haddad *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012; Rousseau *et al.*, 2013).

As comunidades também foram analisadas através da análise exploratória dos dados – multivariada. Na análise multivariada, os métodos utilizados foram a Análise de Componentes Principais (rotação Varimax) e Análise de Agrupamento (Distância Euclidiana e Método Aglomerativo de Ward).

Na área de Angatuba-SP, foram encontrados 1.384 artrópodes no solo distribuídos em 15 táxons, no total das épocas de coleta, sendo que as populações mais abundantes foram dos táxons Oribatida com 57,9 %, Collembola com 18,2 % e Mesostigmata com 8,6 % do total de artrópodes encontrados. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre o evento GM e isolinha controle convencional, nas áreas experimentais dos dois propósitos de uso (Energia e Celulose). A diversidade verificada em Angatuba nas épocas de avaliação foi maior na primeira e quarta épocas e menor na Época 2. Comparando-se a diversidade entre o eucalipto evento H421 e a isolinha convencional clone SP530 nas aplicações Celulose e Energia, verificou-se semelhança nas médias observadas. É possível que a amplitude verificada nos intervalos de confiança entre os índices médios esteja relacionada ao uso do solo, no caso de uma área florestal, isto porque mudanças em um microsítio de solo podem

ocorrer rapidamente alterando as estimativas, particularmente de pequenos organismos (Vargas & Hungria, 1997). Ou seja, em diferentes parcelas de um mesmo tratamento poderá haver heterogeneidade no padrão amostral.

Na área de Araraquara foram encontrados 424 artrópodes distribuídos em 14 táxons entre as épocas de amostragens, sendo que os táxons mais abundantes foram Oribatida com 64,6%, seguido de Mesostigmata com 10,8 % e Collembola com 7,1 %. O teste de comparação de médias mostrou não haver diferenças na densidade populacional dos táxons entre os clones nos dois propósitos de aplicação (Energia e Celulose). As 4 épocas de avaliação em Araraquara não apresentaram variações quanto ao índice de diversidade. Os índices entre clones GM e isolinhas foram similares. Da mesma maneira que em Angatuba, as amplitudes verificadas para o intervalo de confiança podem ser atribuídas a heterogeneidade das parcelas.

Em Caravelas-BA foram encontrados 547 artrópodes distribuídos em 9 táxons entre as épocas de amostragens, sendo que os táxons mais abundantes foram Oribatida com 74,0 %, seguido de Prostigmata com 7,1 % e Mesostigmata com 6,4 %. Não houve diferenças estatísticas significativas entre as densidades populacionais dos táxons entre os clones nos dois métodos de aplicação (Energia e Celulose). A composição das guildas em Caravelas foi similar entre os tratamentos (**Figura VII.8**). A função detritívora foi responsável por 78,8 % do total das funções, seguida da função predadora com 11,1 % e a fitofagia com 9,7 %. A polifagia foi extremamente baixa, com apenas 0,5 % da comunidade. Os clones GM e suas isolinhas nas duas aplicações (Energia e Celulose) não diferiram estatisticamente para as guildas tróficas.

Em Passagem Franca-PI foram encontrados 197 artrópodes distribuídos em 10 táxons entre as épocas de amostragens. Dentre os táxons, Oribatida foi o mais representativo com 53,8 % do total de artrópodes encontrados, seguido de Psocoptera com 14,2 %, e Mesostigmata com 9,6 %. Todos os tratamentos apresentaram semelhança na comparação entre guildas tróficas em Passagem Franca (**Figura VII.6**). A maior porcentagem foi verificada para a função detritívora, com 74,6 % de toda a comunidade, seguido da função fitófaga com 14,7 % e predadora com 9,6 %. Os clones GM e suas isolinhas nas duas configurações de aplicações (energia e celulose) não diferiram estatisticamente para as guildas tróficas.

EN BRANCO

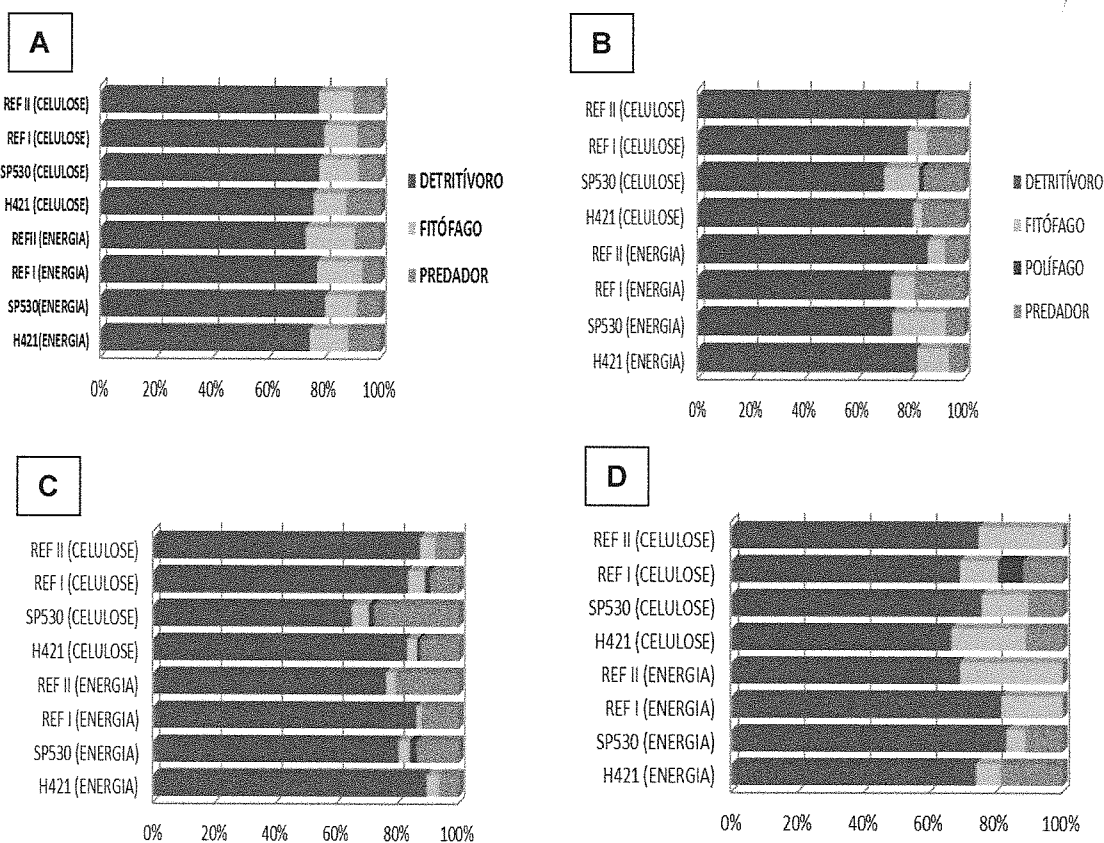


Figura VII.6. Porcentagem das guildas tróficas no levantamento de solo entre os tratamentos evento H421(GM) e clone convencional SP530 comparados às referências comerciais (REF I e II), nos dois métodos de aplicação (Energia e Celulose). A= Angatuba-SP; B= Araraquara-SP; C= Caravelas-BA; D= Passagem Franca-PI 2012/2013.

Na análise conjunta dos dados de diversidade, utilizando o índice de Shanon, levando em consideração as 4 áreas experimentais, foi verificada diferença estatística a nível de local. Em Passagem Franca – PI, o tratamento Ref II (referência comercial convencional II) diferiu dos demais tratamentos (**Tabela VII.3**).

EM BRANCO

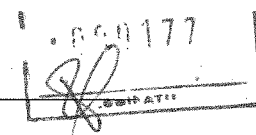


Tabela VII.3. Análise conjunta dos dados para diversidade (Índice de Shanon) de organismos de solo, considerando-se todas as localidades entre os clones de eucalipto. Angatuba-SP, Araraquara-SP, Caravelas-BA e Passagem Franca-PI, 2012/2013.

LOCAL	Clones				MÉDIA
	H421	SP530	REF.I	REF. II	
ANGATUBA	0,66993	0,66437	0,65114	0,68293	0,667093
ARARAQUARA	0,26328	0,56587	0,34780	0,31460	0,372888
CARAVELAS	0,15060	0,22466	0,16182	0,15538	0,173115
PASSAGEM FRANCA	0,45353 a	0,56718 a	0,51026 a	0,20672 b	0,434423
Média	0,384335	0,50552	0,417755	0,339908	0,411879
Trat			ns		
Local			**		
Trat x Local			ns		
CV(%)			54,42		

Artrópodes da Superfície do Solo

As amostragens foram direcionadas na área central de cada parcela, compreendendo as 4 linhas centrais e evitando bordadura de 4 metros do início e fim de cada linha. Uma armadilha do tipo pitfall foi colocada no centro de cada parcela. A armadilha consistia em um recipiente plástico, com diâmetro de 10 cm e 15 cm de altura. Para a instalação da armadilha, um buraco foi cavado no solo, para que os insetos pudessem ser capturados. Um terço do recipiente foi preenchido com solução adequada para a captura e preservação dos insetos (polietileno glicol ou solução com água, detergente 1-2%). Uma cobertura de proteção foi colocada sobre cada armadilha, mas sem afetar o caminhamento e a captura de artrópodes. O período de captura em cada época de coleta foi de 72 horas. A retirada dos artrópodes foi realizada com o auxílio de peneira com malha 0,5 mm de abertura e sobre esta uma tela de "voil" e os artrópodes foram armazenados em recipientes plásticos com álcool a 70%. Qualquer problema, como a perda ou dano ao conteúdo das armadilhas, antes ou durante a coleta, foi registrado nos dados brutos e nas etiquetas das embalagens de acondicionamento das amostras. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Identificação de artrópodes de empresa especializada em até 48 horas depois de terminada a coleta. O material conservado em álcool foi classificado em diferentes táxons, por comparação com coleções de referência ou por meio de literatura específica. Na análise somente foram considerados os exemplares em bom estado para identificação. Exemplares das diferentes espécies foram mantidos em coleção de referência visando identificação por especialistas, se necessário. Os táxons encontrados foram submetidos a análise de variância e as médias obtidas foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para atender as pressuposições básicas da análise de variância os dados foram transformados em raiz de $X + 1$.

As comunidades foram comparadas através do índice de diversidade de Shannon. De acordo com Ricklefs (1990), o uso da diversidade, principalmente de espécies, pode ser aplicado como uma indicação do bem estar de um ecossistema.

EM BRANCO

As comunidades também foram analisadas através da análise exploratória dos dados – multivariada. Na análise multivariada, os métodos utilizados foram a Análise de Componentes Principais (rotação Varimax) e Análise de Agrupamento (Distância Euclidiana e Método Aglomerativo de Ward).

Na área de Angatuba-SP, foram encontrados 5.938 artrópodes na superfície do solo distribuídos em 9 táxons, no total das épocas de coleta, sendo que as populações mais abundantes foram dos táxons Sciaridae spp. com 25,8 %, Collembola com 22,6 % e Nitidulidae spp. com 9,0 % do total de artrópodes encontrados. Na comparação de médias entre os tratamentos foi verificada diferença estatística entre H421 e SP530 no propósito de uso Celulose, sendo que a abundância de *Stelidota* sp. foi maior em H421. Porém não foi verificada diferença entre os clones GM e isolinha no propósito Energia. Todos os clones testados apresentaram similaridade na ocorrência dos grupos funcionais, sendo que o hábito alimentar de maior relevância esteve relacionado à função detritívora. A diversidade verificada em Angatuba ocorreu de forma semelhante em todas as épocas de avaliação. Similaridade na diversidade também foi verificada entre os clones GM e as isolinhas nos propósitos de uso Celulose e Energia. É possível que a amplitude verificada nos intervalos de confiança entre os índices médios esteja relacionada ao uso do solo, no caso de uma área florestal, isto porque mudanças em um microsítio de solo podem ocorrer rapidamente alterando as estimativas, particularmente de pequenos organismos (Vargas & Hungria, 1997). Ou seja, em diferentes parcelas de um mesmo tratamento poderá haver heterogeneidade no padrão amostral.

Na área de Araraquara foram encontrados 24.433 artrópodes distribuídos em 22 táxons entre as épocas de amostragens, sendo que os táxons mais abundantes foram Nitidulidae spp com 46,6 %, seguido de *Carpophilus* spp. com 17,4 % e *Stelidota* sp. com 16,8 %. O teste de comparação de médias mostrou diferenças na densidade populacional de *Carpophilus* spp., porém a diferença foi em relação ao propósito de uso (Energia e Celulose). No propósito de uso para Energia a abundância de *Carpophilus* spp. foi maior do que no propósito de uso para Celulose. A função detritívora foi a que apresentou maior porcentagem na composição das guildas em Araraquara, em torno de 80 %. A porcentagem das guildas tróficas entre os clones foi semelhante entre os clones testados. As 2 últimas épocas de avaliação em Araraquara apresentaram diversidade superior do que as primeiras. Os índices de diversidade entre clones GM e isolinhas convencionais, foram similares, sem diferenças significativas tanto na configuração de propósito de uso para energia como no de celulose, em todas as áreas avaliadas (**Figura VII.7**).

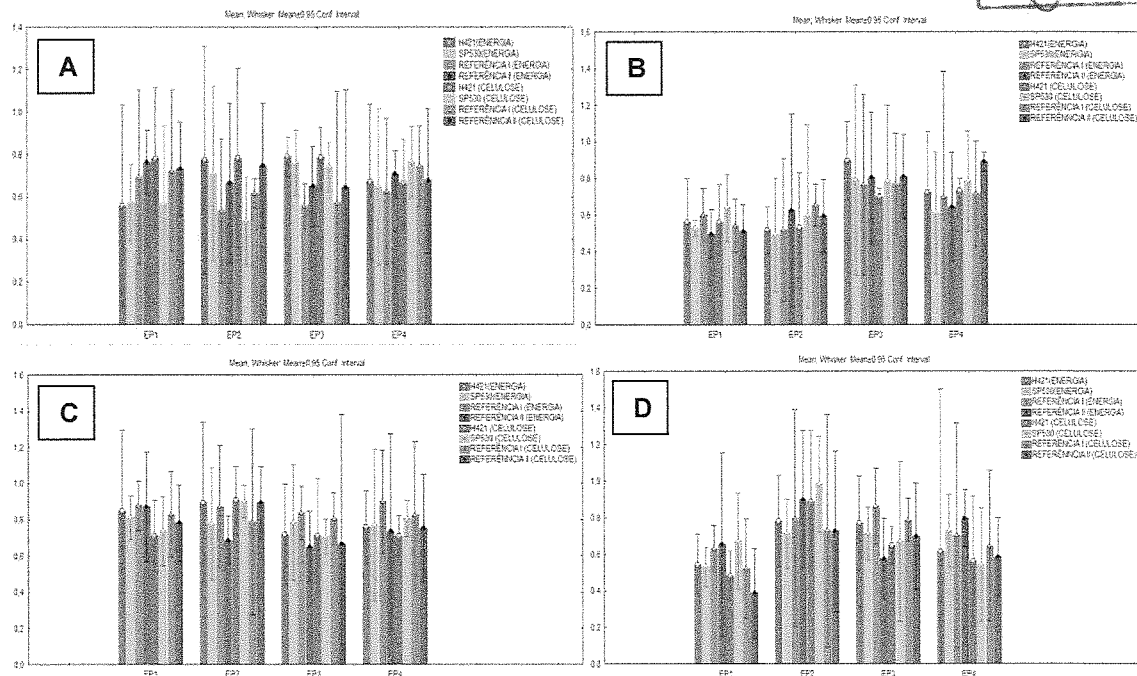


Figura VII.7. Índices de diversidade médios de Shannon para artrópodes de superfície do solo entre o evento H421(GM), o clone controle convencional SP530 e referências comerciais (I e II), nas diferentes épocas de coleta (EP1, EP2, EP3, EP4). A=Angatuba-SP; B=Araraquara-SP, C=Caravelas-BA, D=Passagem Franca-PI, 2012 /2013.

Em Caravelas-BA foram encontrados 7.723 artrópodes distribuídos em 10 táxons entre as épocas de amostragens, sendo que os táxons mais abundantes foram *Pheidole* spp. com 35,1 %, seguido de *Labidura xantophus* com 15,9 % e Nitidulidae spp. com 5,9 %. Não houve diferenças estatísticas significativas entre as densidades populacionais dos táxons entre os clones nos dois propósitos de uso (Energia e Celulose). De modo geral, a composição das guildas em Caravelas ocorreu de forma similar entre os tratamentos. A função polífago teve a maior parcela da comunidade.

Em Passagem Franca-PI foram encontrados 7.178 artrópodes distribuídos em 15 táxons entre as épocas de amostragens. Dentre os táxons, *Solenopsis* sp. foi o mais representativo com 20,5 % do total de artrópodes encontrados, seguido de *Delphacidae* sp.3 com 16,1 % e *Stelidota* spp. com 7,1 %. O táxon *Nitidulidae* spp. e o conjunto de outros táxons não selecionados pela análise faunística "OUTROS" diferiram entre os clones testados. *Nitidulidae* spp. foi mais abundante no propósito de uso Celulose, enquanto que "OUTROS" no clone SP530 foi mais abundante do que H421 no propósito Celulose. No propósito Energia não houve diferença. De modo geral todos os tratamentos apresentaram semelhança na comparação entre as guildas tróficas em Passagem Franca. A maior porcentagem foi verificada para a polifagia.

Na análise conjunta dos dados, levando em consideração as 4 áreas experimentais, foi verificada diferença estatística apenas a nível de local. Caravelas apresentou a maior diversidade de artrópodes de superfície de solo quando comparado com as demais localidades (Tabela VII.4).

EL BIEN

EL BIEN

099100
[Handwritten signature]

Tabela VII.4. Análise conjunta dos dados para diversidade de organismos da superfície do solo considerando-se todas as localidades entre os clones de eucalipto. Angatuba-SP, Araraquara-SP, Caravelas-BA e Passagem Franca-PI, 2012/2013.

LOCAL	Clones				MÉDIA
	H421	SP530	REF.I	REF. II	
ANGATUBA	0,726	0,656	0,633	0,698	0,678
ARARAQUARA	0,653	0,653	0,658	0,672	0,659
CARAVELAS	0,783	0,786	0,842	0,755	0,792
PASSAGEM FRANCA	0,66	0,694	0,709	0,664	0,682
Média	0,706	0,697	0,711	0,697	0,703
Trat			Ns		
Local			**		
Trat x Local			ns		
CV(%)			9,72		

¹ Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. Teste Tukey, ns = não significativo a 5% de probabilidade.
²significativo a 1% de probabilidade.
³CV = Coeficiente de Variação(%).

Artrópodes da Serapilheira

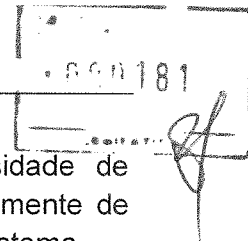
As amostragens foram direcionadas na área central de cada parcela, compreendendo as 4 linhas centrais e evitando bordadura de 4 metros do início e fim de cada linha. Uma amostra composta de serapilheira foi retirada de cada parcela, constituída por 5 subamostras. Como medidor padrão foi utilizado um quadrado metálico de 25 X 25 cm. As subamostras foram retiradas da projeção da copa de plantas distintas, desconsiderando apenas plantas com desenvolvimento inadequado.

O folhíço composto de cada parcela foi peneirado a campo com um aparato constituído de 2 peneiras de malha 0,5 cm. O material peneirado foi acondicionado em sacos de pano, individualmente. As amostras foram etiquetadas com as informações da parcela oriunda e amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Identificação de Artrópodes da empresa especializada contratada, num prazo de até 48 horas após a coleta. Do campo até o laboratório as amostras foram mantidas sob refrigeração (gelo comum ou artificial).

No laboratório o material foi submetido ao extrator de Winkler, que consiste em um funil de pano suspenso. Com ação da gravidade, os organismos presentes na amostra foram extraídos em frascos plásticos contendo álcool a 70 %. Os extratores permaneceram à temperatura ambiente por 72 horas.

Os organismos conservados em álcool foram classificados em diferentes táxons, por comparação com coleções de referência ou por meio de literatura específica. Na análise somente foram considerados os exemplares em bom estado para identificação. Exemplares das diferentes espécies foram mantidos em coleção de referência visando identificação por especialistas, se necessário. Os táxons encontrados foram submetidos a análise de variância e as médias obtidas foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. Para atender as pressuposições básicas da análise de variância os dados foram transformados em raiz de X + 1.

EM BRANCO



As comunidades foram comparadas através do índice de diversidade de Shannon. De acordo com Ricklefs (1990), o uso da diversidade, principalmente de espécies, pode ser aplicado como uma indicação do bem estar de um ecossistema.

As comunidades também foram analisadas através da análise exploratória dos dados – multivariada. Na análise multivariada, os métodos utilizados foram a Análise de Componentes Principais (rotação Varimax) e Análise de Agrupamento (Distância Euclidiana e Método Aglomerativo de Ward).

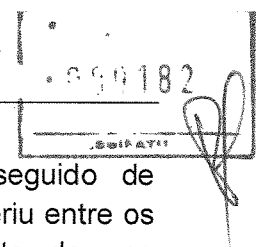
Na área de Angatuba-SP, foram encontrados 5.425 artrópodes na serrapilheira distribuídos em 9 táxons, no total das épocas de coleta, sendo que as populações mais abundantes foram dos táxons Oribatida com 67,0 %, Collembola com 13,5 % e Mesostigmata com 6,5 % do total de artrópodes encontrados. Na comparação de médias entre os tratamentos foi verificada diferença estatística entre H421 e SP530 no propósito de uso Energia para o táxon Phlaeotripidae, sendo que a abundância maior em SP530 do que H421. Porém não foi verificada diferença entre os clones GM e isolinha no propósito Celulose. Todos os clones testados apresentaram similaridade na ocorrência dos grupos funcionais, sendo que o hábito alimentar de maior relevância esteve relacionado a função detritívora. A diversidade verificada em Angatuba ocorreu de forma semelhante em todas as épocas de avaliação. Similaridade na diversidade também foi verificada entre os clones GM e as isolinhas nos propósitos de uso Celulose e Energia. É possível que a amplitude verificada nos intervalos de confiança entre os índices médios esteja relacionada ao uso do solo, no caso de uma área florestal, isto porque mudanças em um microsítio de solo podem ocorrer rapidamente alterando as estimativas, particularmente de pequenos organismos (Vargas & Hungria, 1997). Ou seja, em diferentes parcelas de um mesmo tratamento poderá haver heterogeneidade no padrão amostral.

Na área de Araraquara foram encontrados 1.489 artrópodes distribuídos em 6 táxons entre as épocas de amostragens, sendo que os táxons mais abundantes foram Oribatida com 54,4 %, seguido de Collembola com 11,1 %, Pseudoscorpiones e Phlaeothripidae, ambos com 7,1 %. O teste de comparação de médias não mostrou diferenças na densidade populacional dos táxons entre os clones GM e Isolinha. A função detritívora foi a que apresentou maior porcentagem na composição das guildas em Araraquara, em torno de 70 %. A porcentagem das guildas tróficas entre os clones foi semelhante entre os clones testados. Nas duas primeiras épocas de avaliação em Araraquara não havia serapilheira devido ao pequeno porte das plantas de Eucalipto. Através das duas últimas épocas de avaliação foi possível verificar que os índices entre clones GM e isolinhas foram similares.

Em Caravelas-BA foram encontrados 3.226 artrópodes distribuídos em 8 táxons entre as épocas de amostragens, sendo que os táxons mais abundantes foram Oribatida com 82,5 %, seguido de Mesostigmata com 4,6 % e Araneae spp. com 2,5 %. Diferenças estatísticas foram verificadas para os táxons Araneae spp. e Mesostigmata. No propósito de uso Celulose, o clone SP530 teve maior abundância de Araneae spp. quando comparado a H421, apesar de as médias no propósito de uso para Energia terem sido iguais. Quanto ao táxon Mesostigmata, a diferença esteve relacionada ao propósito de uso (Energia e Celulose). De modo geral, a composição das guildas em Caravelas ocorreu de forma similar entre os tratamentos. A função “detritívoro” teve a maior parcela da comunidade.

Em Passagem Franca-PI foram encontrados 2.302 artrópodes distribuídos em 10 táxons entre as épocas de amostragens. Dentre os táxons, Oribatida foi o mais

EM BRANCO



representativo com 66,4 % do total de artrópodes encontrados, seguido de Mesostigmata com 5,9 % e Collembola com 5,4 %. O táxon Oribatida diferiu entre os clones testados, porém a diferença esteve relacionada ao propósito de uso Energia/Celulose. A abundância de Oribatida no SP530 Energia foi maior do que SP530 Celulose. De modo abrangente, todos os tratamentos apresentaram semelhança na comparação entre as guildas tróficas em Passagem Franca. A guilda Detritívoro teve maior representação, em torno de 80 % da comunidade. Os índices de diversidade foram maiores na época 2 (EP2). Comparativamente o clone geneticamente modificado e sua respectiva isolinha apresentaram semelhança nos índices de diversidade.

Quando as comunidades foram analisadas através dos métodos multivariados, na análise de agrupamento as unidades amostrais se agruparam de forma a não ser possível verificar padrões que diferenciavam os clones testados (**Figura VII.8**). Da mesma forma que na análise de agrupamento a análise de componentes principais não exibiu padrões diferentes entre os clones estudados.

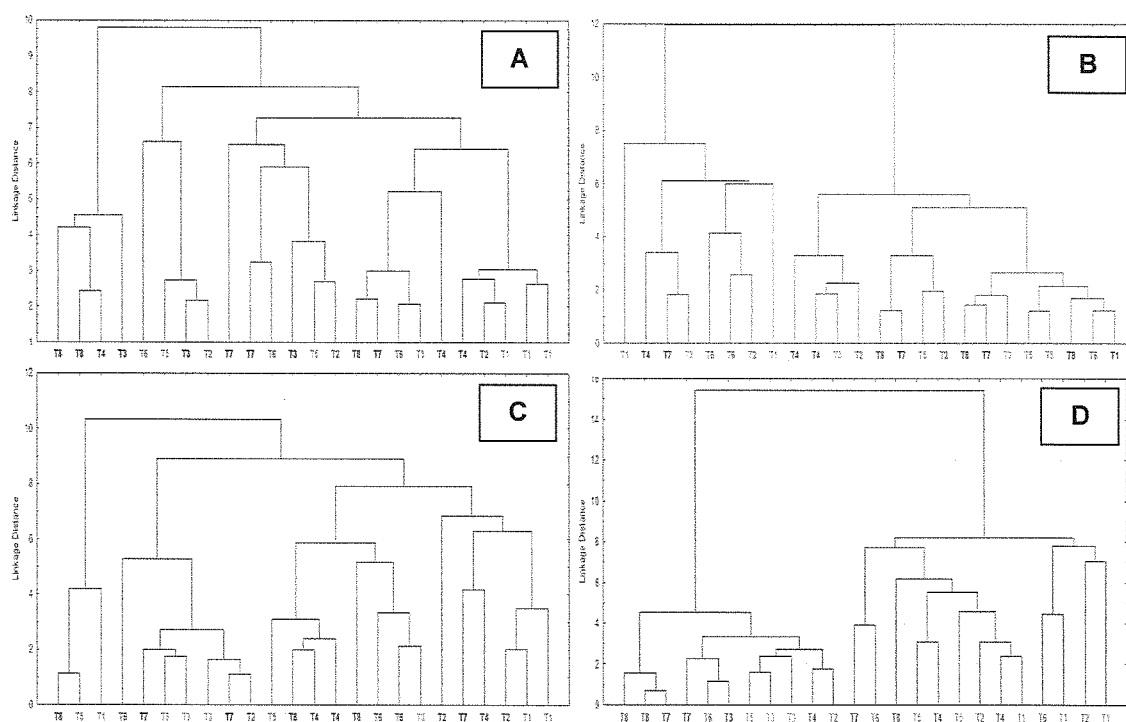


Figura VII.8. Dendrogramas exibindo a estrutura de agrupamento das unidades amostrais em relação a comunidade de artrópodes da serapilheira entre os tratamentos. T1= H421; T2= SP530, T3= REF I, T4= REF II (ENERGIA); T5= H421, T6= SP530, T7= REF I, T8= REF II (CELULOSE), A=Angatuba-SP, B=Araraquara-SP, C=Caravelas-BA, D=Passagem Franca-PI, 2012/2013.

Na análise conjunta dos dados, levando em consideração as 4 áreas experimentais, foi verificada diferença estatística para artrópodes da serapilheira apenas a nível de local. A diversidade em Angatuba foi maior em relação às demais localidades (**Tabela VII.5**).

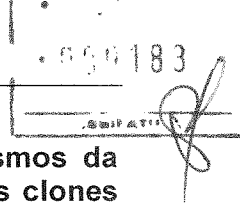


Tabela VII.5. Análise conjunta dos dados para diversidade de organismos da serrapilheira considerando-se todas as localidades entre os clones de eucalipto Angatuba-SP, Araraquara-SP, Caravelas-BA e Passagem Franca-PI, 2012/2013.

LOCAL	Clones				MÉDIA
	H421	SP530	REF. I	REF. II	
ANGATUBA	0,404	0,364	0,391	0,374	0,383
ARARAQUARA	0,276	0,311	0,277	0,29	0,289
CARAVELAS	0,355	0,335	0,281	0,38	0,338
PASSAGEM FRANCA	0,231	0,197	0,243	0,18	0,212
Média	0,316	0,302	0,298	0,306	0,306
Trat					ns
Local					**
Trat x Local					ns
CV(%)					21,67

¹ Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. Teste Tukey, ns = não significativo a 5% de probabilidade.

**significativo a 1% de probabilidade,

²CV = Coeficiente de Variação(%).

Artrópodes da Parte Aérea

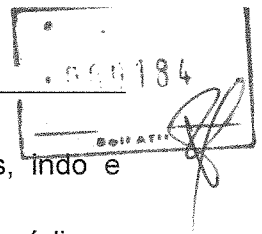
Nos levantamentos de artrópodes da parte aérea, as moscas predadoras, Empididae sp. ou *Micremphis* sp. estiveram presentes em todos os locais em estudo. O psílideo *Ctenarytaina spatulata* foi abundante em Angatuba-SP, Araraquara-SP e Passagem Franca-PI. As guildas Fitófago e Predador foram as mais representativas. O cartão atrativo amarelo foi o método que proporcionou a maior abundância de insetos. No propósito de uso Celulose a abundância de insetos foi superior ao propósito Energia. A diversidade de espécies foi maior em Araraquara-SP. Não foram encontrados efeitos adversos a fauna de artrópodes da parte aérea entre o eucalipto geneticamente modificado, evento H421, e sua isolinha controle convencional, clone SP530.

As amostragens foram direcionadas na área central de cada parcela, compreendendo 3 armadilhas de cartão adesivo (nas cores amarela, azul e verde) e avaliações visuais. As armadilhas foram posicionadas na planta de eucalipto acompanhando o seu crescimento até a altura limite de 1,5 a 2,0 m partir do solo e permaneceram na área por um período de 72 horas. Ao final do período de captura, cada armadilha devidamente identificada foi embalada individualmente em filme plástico, para evitar danos aos insetos capturados, sendo depois reunidas por parcela.

Para a avaliação visual, foram amostradas 10 plantas por parcela, tomando-se um ramo por planta, na área útil da parcela. Quatro linhas centrais compreenderam a área útil, excluindo-se pelo menos 4 metros do início e fim de cada linha. Plantas com desenvolvimento inadequado não foram amostradas.

Os ramos foram sacudidos por 30 segundos dentro de um saco plástico de tamanho suficiente para envolver todo o ramo e conseguir extrair os artrópodes da planta.

Quando a altura da planta não permitiu que ramos pudessem serem analisados, uma rede entomológica retrátil de até 9 metros foi utilizada para a captura dos artrópodes sobre as plantas de eucalipto. A rede foi usada diretamente sobre as



plantas em movimento de “U”, enquanto se caminhava pelas entrelinhas, indo e voltando.

Os artrópodes capturados foram quantificados, separados por morfocódigos, registrando-se em livro de campo. Posteriormente foram encaminhados em álcool 70% para o laboratório especializado em identificação de artrópodes para a confirmação da identificação. A identificação foi realizada por comparação com coleções de referência ou por meio de literatura específica. O envio se deu em um período máximo de 48 horas após a finalização da coleta.

O material foi classificado em diferentes táxons, por comparação com coleções de referências ou por meio de literatura. Na análise foram considerados somente os exemplares em estado adequado para a identificação, sendo que larvas e partes isoladas do corpo de insetos foram desconsideradas. Exemplares foram mantidos em coleção de referência visando identificação por especialistas, se necessário.

Os táxons encontrados foram submetidos a análise de variância e as médias obtidas foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. Para atender as pressuposições básicas da análise de variância os dados foram transformados em raiz de $X + 1$.

Foi utilizado o programa ANAFU desenvolvido pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz - ESALQ (Morales *et al.*, 2003). Nesta análise foram considerados os dados obtidos para o total de indivíduos encontrados em cada tratamento (somatório das repetições) e somatório de indivíduos encontrados. O programa foi desenvolvido para ser aplicado em análises faunísticas de agroecossistemas enfocando os táxons predominantes onde, geralmente, as pragas estão incluídas. A análise não enfatiza os táxons raros e acidentais (*singletons*), por serem mais importantes nos ecossistemas naturais. Esse software permite caracterizar uma comunidade pelos índices de frequência (porcentagem de indivíduos de um táxon em relação ao total de indivíduos), abundância (número de indivíduos por unidade de área), dominância (ação exercida pelos táxons que recebem o impacto do meio ambiente e o transforma, podendo com isso causar o aparecimento ou desaparecimento de outras espécies).

As comunidades foram comparadas através do índice de diversidade de Shannon. De acordo com Ricklefs (1990), o uso da diversidade, principalmente de espécies, pode ser aplicado como uma indicação do bem estar de um ecossistema.

As comunidades também foram analisadas através da análise exploratória dos dados – multivariada. Na análise multivariada, os métodos utilizados foram a Análise de Componentes Principais (rotação Varimax) e Análise de Agrupamento (Distância Euclidiana e Método Aglomerativo de Ward).

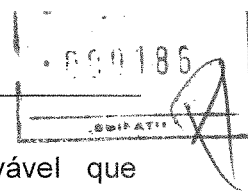
Na área de Angatuba-SP, no cartão amarelo, foram capturados 1.005 indivíduos na parte aérea distribuídos em oito táxons, no total das épocas de coleta, sendo que as populações mais abundantes foram dos táxons *Ctenarytaina spatulata*, com 19,5 %, Sciaridae spp. com 15,0 % e *Micrempis* sp. com 12,3 % do total de artrópodes encontrados. No cartão verde foram capturados 755 indivíduos, distribuídos em oito táxons, sendo *Micrempis* sp., *C. spatulata* e Sciaridae spp. os táxons mais abundantes com 15,2 %, 14,7 % e 12,5 %, respectivamente. No cartão azul foram capturados 583 indivíduos distribuídos em sete táxons, sendo que os mais abundantes foram os táxons Sciaridae spp. com 20,6 %, *Micrempis* sp. com 14,1 % e Empididae sp. com 10,8 %. Foram verificadas diferenças estatísticas para as populações de Thripidae sp.1 através do método cartão verde e Empididae sp. no cartão azul. Em ambas, as

EM BRANCO

diferenças nas populações estiveram relacionadas ao propósito de uso (Energia e Celulose). O número médio de indivíduos capturados em todos os métodos de cartões atrativos foi superior no objetivo de uso para Celulose quando comparado ao para Energia. Na análise visual foram encontrados 830 artrópodes, distribuídos em 8 táxons, no total das épocas de coleta, sendo que as populações mais abundantes foram dos táxons Collembola com 24,2 %, Galumnidae sp. com 15,4 % e Phytoseiidae sp. com 11,2 % do total de artrópodes encontrados. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre o eucalipto geneticamente modificado evento H421 e sua isolinha convencional, clone SP530, nos dois propósitos de uso (Energia e Celulose). A composição funcional trófica (Guildas) da comunidade de artrópodes da parte aérea entre os cartões atrativos amarelos em Angatuba é apresentada na Figura 9. No método cartão amarelo e verde as funções fitofagia e predação representaram a maior parcela da comunidade, juntas corresponderam por volta de 80 % da comunidade. No método cartão azul, as funções predação e detritívora foram as que representaram maior porcentagem da comunidade, em torno de 80 %. O clone H421 (celulose) apresentou maior porcentagem da função detritívora comparado aos demais clones no cartão verde. Contudo, de modo geral, as funções para cada método de cartão atrativo ocorreu de maneira semelhante. Comparativamente entre os métodos, a função parasitóide não foi encontrada no método cartão azul e a função ND (não definida) ocorreu apenas no método cartão amarelo.

Em Araraquara-SP, no cartão amarelo, foram capturados 10.518 indivíduos na parte aérea distribuídos em 15 táxons, no total das épocas de coleta, sendo que as populações mais abundantes foram dos táxons *C. spatulata* com 49,9 %, *Elachiptera* sp. com 12,9 % e Formicidae alada 1 com 8,1 % do total de artrópodes encontrados. No cartão verde foram capturados 8.505 indivíduos, distribuídos em 16 táxons, sendo *C. spatulata*, Empididae sp. e Formicidae alada 1 os táxons mais abundantes, com 46,4 %, 15,3 % e 10,6 %, respectivamente. No cartão azul foram capturados 3.381 indivíduos distribuídos em 11 táxons, sendo que os mais abundantes foram os táxons Empididae sp. com 17,5 %, *C. spatulata* com 15,4 % e Thripidae sp.1 com 10,8 %. Foram verificadas diferenças estatísticas para as populações de Cicadellidae sp.184 e Ceraphronidae sp. no método cartão amarelo. Ceraphronidae sp., *Condylostylus* sp., *C. spatulata*, Thripidae sp.1 e Outros diferiram no método cartão verde. A população Formicidae alada 1 diferiu no método cartão azul. As diferenças verificadas estiveram relacionadas ao propósito de uso (Energia e Celulose), exceto para a população Formicidae alada 1, a qual ocorreu em maior quantidade no clone SP530 (Energia) comparado com o evento H421 (Energia). Formigas aladas no período da revoada podem ocorrer de maneira heterogênea, isto porque forrageiam usualmente partindo de um local ou ninho fixo (Fourcassie & Oliveira, 2002). A função fitofagia foi a que apresentou maior porcentagem na composição das guildas em Araraquara, para o método cartão amarelo, em torno de 80 % da comunidade (Figura 9). No método cartão verde, a fitofagia também apresentou a maior porcentagem na composição das guildas, em torno de 70 %. No método cartão azul, a predação ocorreu de forma semelhante que a fitofagia, aproximadamente 45 % e também do mesmo modo que o ocorrido em Angatuba, o cartão azul não representou a função parasitóide. Em todos os métodos, a isolinha SP530 no propósito energia apresentou maior porcentagem para a função ND (Não definida). O critério ND se refere a formigas aladas, sendo que o comportamento e ocorrência destes insetos estão diretamente relacionados às revoadas, que por sua vez exibe padrão heterogêneo dentro da área experimental,

EM BRANCO



pois é definido pela distribuição dos ninhos. Dessa forma, é provável que abertura/saída de alguma colônia esteja presente em parcela do tratamento SP530 (Energia).

Em Caravelas-BA, no método cartão amarelo foram capturados 1.101 indivíduos distribuídos em 9 táxons entre as épocas de amostragens, sendo que os táxons mais abundantes foram *Micrempis* sp. com 18,3 %, seguido de Empididae sp. com 13,5 % e Sciaridae spp. com 11,0 %. No método cartão verde foram capturados 890 indivíduos distribuídos em 8 táxons, sendo *Micrempis* sp., Empididae sp. e Sciaridae spp. os táxons mais abundantes, respectivamente 22,5 %, 16,1 % e 12,2 %. No método cartão azul foram capturados 386 indivíduos distribuídos em 7 táxons, sendo os mais abundantes Sciaridae spp. com 28,8 %, Empididae sp. com 10,9 % e *Micrempis* sp. com 8,3 %. As densidades populacionais de Tachinidae (Trichopodini) e Thripidae sp.1 diferiram entre os clones no método cartão amarelo. No método cartão azul foram verificadas diferenças para *Micrempis* sp. e Thripidae sp.1. De modo geral, as diferenças estiveram relacionadas ao propósito de uso, isto porque, no critério celulose a captura de insetos foi maior que no critério energia. Apesar de *Micrempis* sp. ter diferido entre os clones H421 e SP530, ambos no propósito de uso Energia, não foi verificado diferença para o propósito de uso Celulose. A composição das guildas em Caravelas foi similar entre os tratamentos. No método cartão amarelo e verde, a função predador foi a maior, representando em torno de 50 % da comunidade de artrópodes. No método cartão azul a função detritívora foi a maior, representando em torno de 40 a 50 % da comunidade de artrópodes (**Figura VII.9**).

Em Passagem Franca-PI foram capturados 3.196 indivíduos distribuídos em 19 táxons entre as épocas de amostragens no método cartão amarelo, sendo mais abundante os táxons Thripidae sp.1 com 51,7 %, *C. spatulata* com 8,6 % e *Micrempis* sp. com 4,4 %. No método cartão verde foram capturados 2.198 indivíduos distribuídos em 15 táxons, sendo mais abundante os táxons Thripidae sp.1 com 41,3 %, *C. spatulata* com 11,1 % e *Micrempis* sp. com 5,4 %. No método cartão azul foram capturados 716 indivíduos distribuídos em 10 táxons, sendo mais abundante Thripidae sp.1 com 26,0 %, Thripidae sp.2 com 13,3 % e Sciaridae spp. com 10,3 %. Diferenças estatísticas foram verificadas para Aphididae spp., Ceraphronidae sp., e Formicidae alada 2 para o método cartão amarelo. No método cartão verde, *C. spatulata* diferiu entre os tratamentos. As diferenças estiveram relacionadas ao propósito de uso Energia/Celulose.

De forma abrangente em todos os locais, o fato do propósito de uso Celulose ter obtido um incremento na abundância de insetos pode ser explicado devido ao espaçamento. Espaçamentos mais adensados, como os utilizados no propósito Energia, propiciam maior competição entre plantas pela oferta de água e incidência luminosa, sendo o contrário verificado em espaçamentos menos adensados, como no propósito de uso para Celulose. É possível que a dinâmica populacional dos insetos esteja diretamente relacionada ao tipo de espaçamento, pois os nichos disponíveis serão diferentes, havendo variação na estrutura do dossel, na quantidade de serapilheira disponível, na quantidade e distância de plantas que servirão como abrigo e alimento disponível para os insetos. Rocha (2010) correlacionou maior espaçamento com aumento na abundância de insetos em plantios florestais.

Os índices de diversidade médios foram baixos na primeira época de avaliação em todos os métodos de cartão atrativo. Os índices foram acrescidos nas demais

épocas apesar de haver gradual diminuição no decorrer do tempo a partir da segunda época.

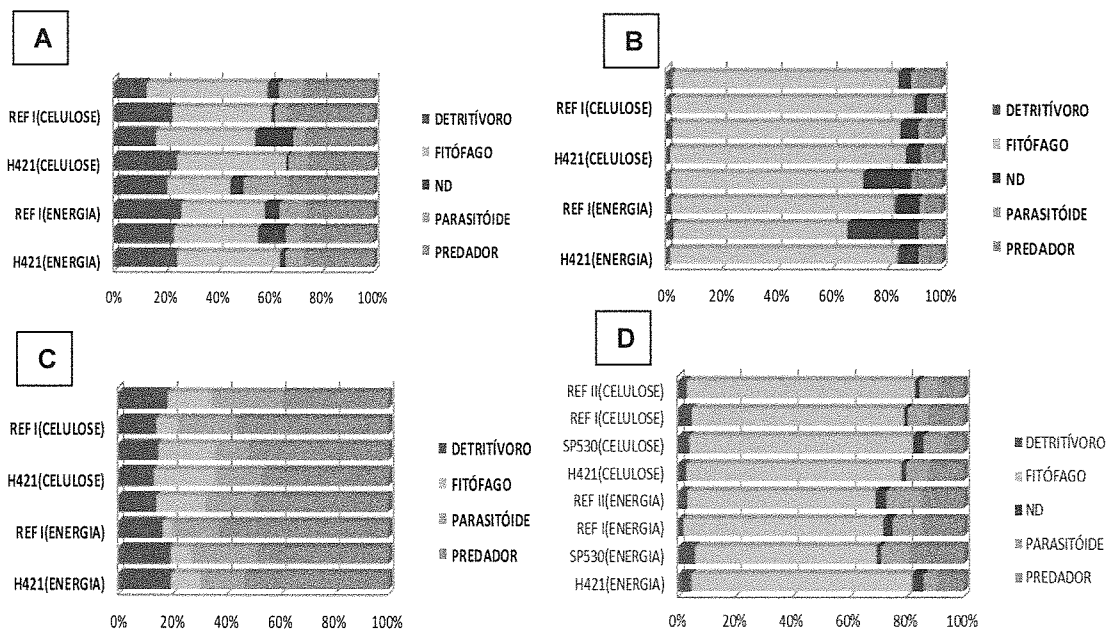


Figura VII.9. Porcentagem das guildas tróficas no cartão amarelo entre os clones H421(GM) e SP530 (ISOLINHA) e referências comerciais (REF I e II) nos dois métodos de aplicação (Energia e Celulose). A=Angatuba-SP, B=Araraquara-SP, C=Caravelas-BA e D=Passagem Franca-PI, 2012/2013.

A diversidade verificada em Angatuba nas épocas de avaliação foi maior na primeira e segunda épocas de avaliação (EP1 e EP2) e menor nas épocas 3 e 4 (EP3 e EP4) (Figuras 4). Comparando-se a diversidade entre os clones GM e as isolinhas nos propósitos de uso Celulose e Energia, verificou-se semelhança nas médias observadas. É possível que a amplitude verificada nos intervalos de confiança entre os índices médios esteja relacionada ao tipo de ecossistema, no caso de um sistema floresta plantada. Ou seja, em diferentes parcelas de um mesmo tratamento poderá haver heterogeneidade no padrão amostral.

Comparando os clones geneticamente modificados (GM) com suas isolinhas quanto ao número de indivíduos que compuseram as guildas tróficas entre os métodos avaliados, nos diferentes propósitos, energia e celulose, diferenças estatísticas foram verificadas na guilda parasitoide no método cartão amarelo. Nas guildas fitófago e parasitoide no método cartão verde e nas guildas ND e predador no método cartão azul. As diferenças estiveram relacionadas ao propósito de uso, sendo que no critério celulose as guildas tinham mais indivíduos do que no critério energia. Exceção ocorreu para a função ND, relacionada a formigas aladas, sendo que a diferença, também verificada em Araraquara entre o clone geneticamente modificado, H421, e sua isolinha, SP530, em virtude da biologia de formigas na distribuição dos ninhos. Nas 4 épocas de avaliação em Araraquara, os índices de diversidade foram similares entre os clones GM (H421) e isolinhas (SP530). Da mesma maneira que em Angatuba, as

EM BRANCO

amplitudes verificadas para o intervalo de confiança podem ser atribuídas à heterogeneidade das parcelas.

Em Caravelas, nas 4 épocas de avaliação, os índices de diversidade foram similares entre os clones GM (H421) e isolinhas (SP530). Todos os tratamentos apresentaram semelhança na comparação entre guildas trófica em Passagem Franca. Em todos os métodos de cartão atrativo a guilda fitófago representou a maior parcela da comunidade, em torno de 60% (Figura VII.10). A guilda ND não ocorreu no cartão azul.

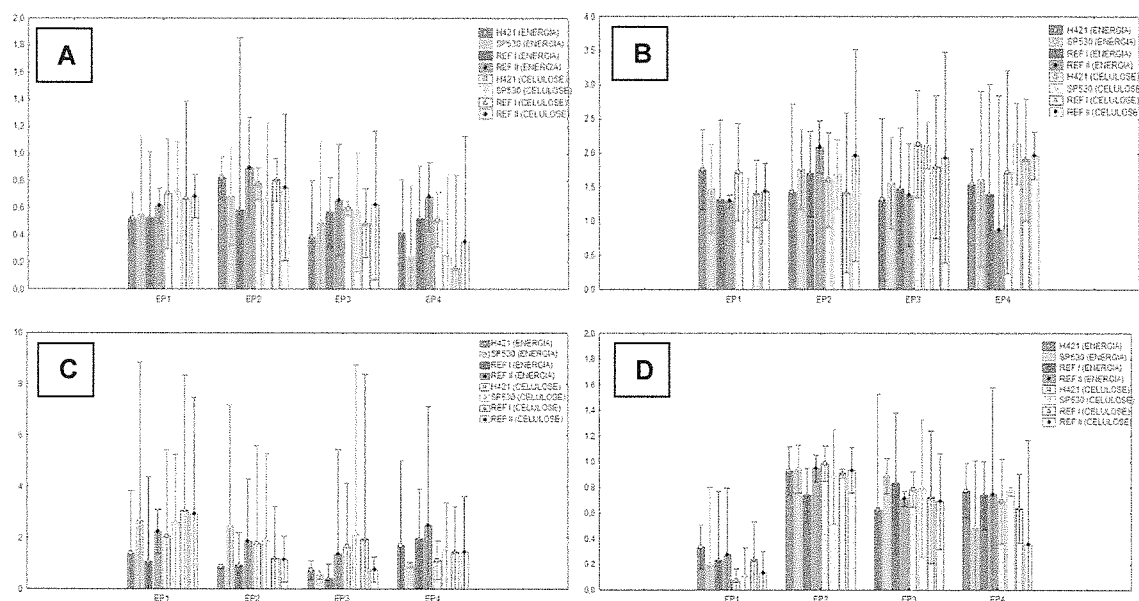


Figura VII.10. Índices de diversidade médios de Shannon para armadilha adesiva Cartão Amarelo entre o evento H421, clone convencional SP530 e referências comerciais, em quatro épocas de coleta (EP1, EP2, EP3, EP4).. A=Angatuba-SP, B=Araraquara-SP, C=Caravelas-BA, D=Passagem Franca-PI, 2012 /2013.

Na análise conjunta dos dados, levando em consideração as quatro áreas experimentais, foi verificada diferença estatística em nível de local (Tabela VII.6). Dentro do local, no método cartão amarelo apenas em Caravelas-BA houve diferença entre os clones testados.

EM BRANCO

EM BRANCO

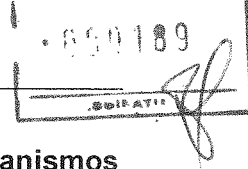


Tabela VII.6. Análise conjunta dos dados para diversidade de organismos considerando-se todas as localidades entre os clones de eucalipto. Angatuba-SP, Araraquara-SP, Caravelas-BA e Passagem Franca-PI. Cartão Amarelo, 2012/2013.

LOCAL	Clones				MÉDIA
	H421	SP530	REF.I	REF. II	
ANGATUBA	0,593	0,522	0,542	0,66	0,579
ARARAQUARA	1,651	1,687	1,548	1,615	1,625
CARAVELAS	1,421	1,847	1,512	1,785	* 1,641
PASSAGEM FRANCA	0,649	0,632	0,631	0,599	0,628
Média	1,079	1,172	1,058	1,165	1,118
Trat				ns	
Local				**	
Trat x Local				ns	
CV(%)				24,71	

¹ Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. Teste Tukey, ns = não significativo a 5% de probabilidade. **significativo a 1% de probabilidade,
²CV = Coeficiente de Variação(%).

Na análise conjunta dos dados, levando em consideração as quatro áreas experimentais e todas as armadilhas adesivas, foi verificada diferença estatística apenas em nível de local (Tabela VII.7). Caravelas - BA e Passagem Franca - PI tiveram os maiores índices. Os clones não diferiram para a diversidade de artrópodes.

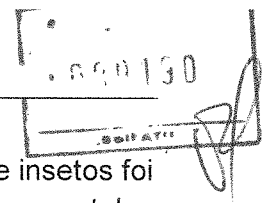
Tabela VII.7. Análise conjunta dos dados para diversidade de organismos considerando-se todas as localidades entre os clones de eucalipto no somatório de Angatuba-SP, Araraquara-SP, Caravelas-BA e Passagem Franca-PI, considerando as armadilhas adesivas de todas as cores, 2012/2013.

LOCAL	Clones				MÉDIA
	H421	SP530	REF.I	REF. II	
ANGATUBA	1,471	1,557	1,129	1,357	1,378
ARARAQUARA	1,108	1,436	1,407	1,632	1,396
CARAVELAS	1,872	2,270	2,194	2,557	2,223
PASSAGEM FRANCA	2,150	3,177	2,669	2,095	2,523
Média	1,650	2,110	1,850	1,910	1,880
Trat				Ns	
Local				**	
Trat x Local				Ns	
CV(%)				28,46	

Nas condições que os estudos foram conduzidos é possível concluir que:

- O cartão atrativo amarelo foi o método que proporcionou a maior abundância de insetos;

EM BRANCO



- De modo abrangente, no propósito de uso Celulose a abundância de insetos foi superior ao propósito Energia; tanto na avaliação individual das cartelas adesivas, bem como no somatório das mesmas.
- As guildas Fitófago e Predador foram as mais representativas;
- Moscas predadores, *Empididae* sp. ou *Micrempis* sp. estiveram presentes em todos os locais em estudo.;
- O evento H421 manteve populações de inimigos naturais, como Tachinidade (*Trichopodini*), *Stethorus* sp. (Coccinellidae), *Empididae* sp. e *Micrempis* sp. (Empididae);
- O psílideo *Ctenarytaina spatulata* foi abundante em Angatuba, Araraquara e Passagem Franca;
- A diversidade de espécies foi maior em Araraquara-SP na avaliação individual das cartelas adesivas e maior em Passagem Franca - PI e em Caravelas - BA no somatório das cartelas.
- Não foram encontrados efeitos adversos a fauna de artrópodes da parte aérea entre o eucalipto geneticamente modificado evento H421 e sua isolinha controle convencional clone SP530.

Análise Visual de Artrópodes

Foram amostradas dez plantas por parcela, tomando-se um ramo por planta, na área útil da parcela. Quatro linhas centrais compreenderam a área útil, excluindo-se pelo menos 4 metros do início e fim de cada linha. Plantas com desenvolvimento inadequado não foram amostradas.

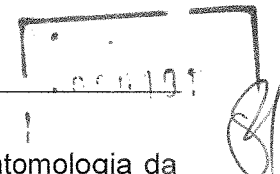
Os ramos foram sacudidos por 30 segundos dentro de um saco plástico de tamanho suficiente para envolver todo o ramo e conseguir extrair os artrópodes da planta.

Quando a altura da planta não permitiu que ramos pudessem ser analisados, uma rede entomológica retrátil de até 9 metros foi utilizada para a captura dos artrópodes sobre as plantas de eucalipto. A rede foi usada diretamente sobre as plantas em movimento de "U", enquanto se caminhava pelas entrelinhas, indo e voltando.

Os artrópodes capturados foram quantificados, separados por morfocódigos, registrando-se em livro de campo. Posteriormente foram encaminhados em álcool 70% para o Laboratório de Identificação de Artrópodes especializado, contratado para a confirmação da identificação. A identificação foi realizada por comparação com coleções de referência ou por meio de literatura específica.

Exemplares foram mantidos em coleção de referência visando identificação por especialistas, quando necessário. Os táxons encontrados foram submetidos a análise de variância e as médias obtidas foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para atender as pressuposições básicas da análise de variância os dados foram transformados em raiz de $X + 1$.

EMERSON



Foi utilizado o programa ANAFU desenvolvido pelo Depto. de Entomologia da ESALQ (Moraes *et al.*, 2003). Nesta análise foram considerados os dados obtidos para o total de indivíduos encontrados em cada tratamento (somatório das repetições) e somatório de indivíduos encontrados. O programa foi desenvolvido para ser aplicado em análises faunísticas de agroecossistemas enfocando os táxons predominantes onde, geralmente, as pragas estão incluídas. A análise não enfatiza os táxons raros e acidentais (*singletons*), por serem mais importantes nos ecossistemas naturais. Esse software permite caracterizar uma comunidade pelos índices de frequência (porcentagem de indivíduos de um táxon em relação ao total de indivíduos), abundância (número de indivíduos por unidade de área), dominância (ação exercida pelos táxons que recebem o impacto do meio ambiente e o transforma, podendo com isso causar o aparecimento ou desaparecimento de outras espécies).

As comunidades foram comparadas através do índice de diversidade de Shannon. De acordo com Ricklefs (1990), o uso da diversidade, principalmente de espécies, pode ser aplicado como uma indicação do bem estar de um ecossistema.

As comunidades também foram analisadas através da análise exploratória dos dados – multivariada. Na análise multivariada, os métodos utilizados foram a Análise de Componentes Principais (rotação Varimax) e Análise de Agrupamento (Distância Euclidiana e Método Aglomerativo de Ward).

Na área de Angatuba-SP, foram encontrados 830 artrópodes na análise visual distribuídos em 8 táxons, no total das épocas de coleta, sendo que as populações mais abundantes foram dos táxons Collembola com 24,2 %, Galumnidae sp. com 15,4 % e Phytoseiidae sp. com 11,2 % do total de artrópodes encontrados. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os clones GM e Isolinha nos dois propósitos de uso (Energia e Celulose). Todos os clones testados apresentaram similaridade na ocorrência dos grupos funcionais, sendo que o hábito alimentar de maior relevância esteve relacionado a função detritívora. A fitofagia e a predação, em menor porcentagem. A diversidade verificada em Angatuba nas épocas de avaliação foi maior na segunda e terceira épocas (EP2 e EP3) (**Figura VII.11.A**). Comparando-se a diversidade entre os clones GM e as isolinhas nas aplicações Celulose e Energia verificou-se semelhança nas médias observadas. A amplitude verificada no intervalo de confiança sugere haver heterogeneidade no padrão amostral.

Na área de Araraquara foram encontrados 1.305 artrópodes distribuídos em 7 táxons entre as épocas de amostragens, sendo que os táxons mais abundantes foram Psyllidae spp. com 25,4 %, seguido de Psocoptera spp. com 20,2 % e Curculionidae sp. com 20,0 %. O teste de comparação de médias mostrou diferença na densidade populacional de Psocoptera spp. A diferença esteve relacionada ao propósito de uso, sendo que no propósito energia a abundância foi maior. A função fitófaga foi a que apresentou maior porcentagem na composição das guildas em Araraquara, em torno de 80 %. Na sequência, compartilharam 20 % da comunidade, Predadores e Parasitóides. Na sequência e com menor expressão, as funções ficaram definidas pela predação e fitofagia. A porcentagem verificada pela polifagia foi extremamente baixa e verificada apenas nas aplicações celulose para a isolinha SP530 e Referência II. Dentre as 4 épocas de avaliação em Araraquara, a diversidade verificada na última época foi maior do que as demais (**Figura VII.11.B**). Os índices entre clones GM e isolinhas foram similares.

Em Caravelas-BA foram encontrados 839 artrópodes distribuídos em 15 táxons entre as épocas de amostragens, sendo que os táxons mais abundantes foram

EM BRANCO

Cecidomyiidae spp. com 16,2 %, seguido de Sciaridae spp. com 10,1 % e Psocoptera spp. com 8,2 %. Houve diferença estatística para o táxon Aderidae sp., sendo que H421 no propósito Energia teve maior abundância do que sua isolinha. Porém no propósito Celulose não houve diferença. A composição das guildas em Caravelas apresentou H421 energia com a função detritívora pouco maior que os demais clones, sendo que de modo geral a ocorrência das guildas foi similar. A função fitófaga foi a que ocorreu em maior proporção. Analisando os índices de diversidade entre as épocas de avaliação foi possível verificar que entre as épocas os índices foram similares entre os clones analisados. A terceira época (EP3) apresentou maior índice de diversidade (**Figura VI.11.C**).

Em Passagem Franca-PI foram encontrados 637 artrópodes distribuídos em 6 táxons entre as épocas de amostragens. Dentre os táxons, *Ctenarytaina spatulata* foi o mais representativo com 24,5 % do total de artrópodes encontrados, seguido de Cecidomyiidae spp. com 15,1 %, e Cicadellidae sp. com 7,5 %. Comparando as populações entre clones analisados, não foram verificadas diferenças estatísticas. Todos os tratamentos apresentaram semelhança na comparação entre guildas trófica em Passagem Franca. Mais de 80% dos artrópodes encontrados sobre as plantas de eucalipto foram da guilda Fitófago. Nesta área a diversidade foi nula na primeira e na última época de avaliação (**Figura VII.11.D**). Na terceira época foi possível comparar os clones estudados, sendo verificada similaridade nos índices médios.

Na análise conjunta dos dados, levando em consideração as 4 áreas experimentais, foi verificada diferença estatística apenas a nível de local (**Tabela VII.8**).

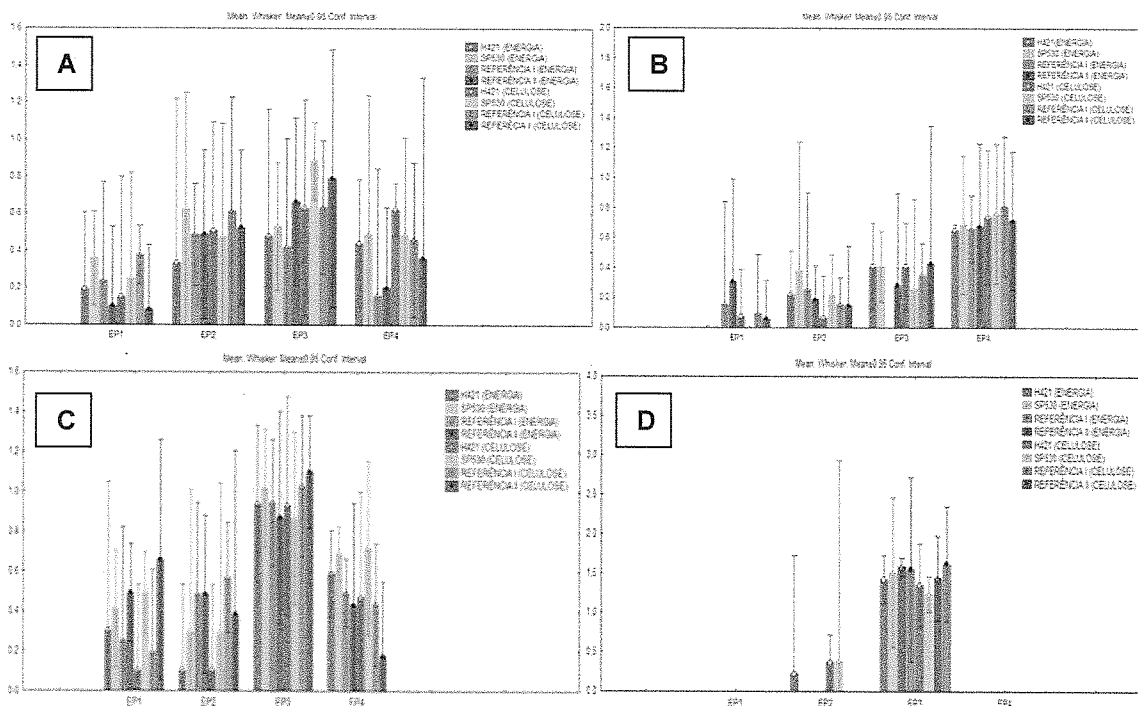


Figura VII.11. Índices de diversidade médios de Shannon para análise visual entre o evento H421, clone convencional SP530 e referências comerciais, em quatro épocas de coleta (EP1, EP2, EP3, EP4). A=Angatuba-SP, B=Araraquara-SP, C=Caravelas-BA, D=Passagem Franca-PI, 2012 /2013.

EM BRANCO

Tabela VII.8. Análise conjunta dos dados para diversidade de organismos na análise visual considerando-se todas as localidades entre os clones de eucalipto Angatuba-SP, Araraquara-SP, Caravelas-BA e Passagem Franca-PI, 2012/2013.

LOCAL	Clones				MÉDIA
	H421	SP530	REF.I	REF. II	
ANGATUBA	0,42	0,51	0,42	0,40	0,44
ARARAQUARA	0,32	0,34	0,34	0,44	0,36
CARAVELAS	0,41	0,60	0,55	0,57	0,53
PASSAGEM FRANCA	0,35	0,33	0,27	0,23	0,30
	0,375	0,445	0,395	0,410	0,41
Trat	ns				
Local	**				
Trat x Local	ns				
CV(%)	24,78				

¹ Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. Teste Tukey, ns = não significativo a 5% de probabilidade. **significativo a 1% de probabilidade.

²CV = Coeficiente de Variação(%).

Não foram encontrados efeitos adversos à fauna de artrópodes entre o eucalipto geneticamente modificado evento H421 e seu controle convencional clone SP530 nos levantamentos e observações realizados em quatro diferentes ambientes representativos da cultura do eucalipto no Brasil, em todas as estações climáticas do ano, utilizando variados métodos para avaliação dos principais estratos de artrópodes visitantes das florestas cultivadas.

3.2. ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE EM ORGANISMOS INDICADORES

Para a estimativa do aporte de biomassa de eucalipto no solo, utilizado para a instalação dos ensaios toxicológicos com tecidos de eucalipto com organismo indicadores como microrganismos (fungos e bactérias) e minhocas, foram utilizadas as informações de que, considerando os componentes da árvore acima do solo, ou à sua parte aérea (fuste, casca, copa, galhos, folhas, frutos, flores), a madeira do fuste representa entre 78 a 85 % do peso seco total da árvore acima do solo (Foelkel, 2007). Posto isto, se considerar-se que 150 toneladas de madeira representam cerca de 80% do peso seco da árvore, os outros 20 % seriam representados por folhas, ramos, frutos, flores, casca, etc, em um total de 37,5 ton por ha. Se considerarmos que os organismos vivem mais intensamente até 20 cm de profundidade no solo, ou em 2.000 m³ de solo por hectare, e se consideramos a densidade de 1,5 ton/m³ de solo, teremos 37,5 toneladas de eucalipto em 3.000 ton de solo, ou seja, 37,5 gramas em 3.000 gramas ou 12,5 gramas por kg de solo. Para efeito do estudo, considerou-se utilizar inicialmente um volume até 5 X maior de aporte como ponto máximo da curva, o que representaria adicionar 62,5 gramas de tecidos processados (mistura de folhas, ramos e casca moídos) por kg de solo.

Para adição de tecidos na água, nos ensaios com microcrustáceos e peixes, foram utilizados dados disponíveis de aporte de resíduos máximo de subprodutos da cultura do milho em curso de água, de 7,9 g de matéria seca livre de cinzas por m² de

EM BRANCO

canal. Sedimentos bentônicos nos cursos continuam até 6,4 g de matéria seca livre de cinzas (Rosi-Marshall, 2007).

De forma geral, o uso de concentrações exacerbadas provocou efeitos nas populações, tanto com a substância-teste como com o controle convencional, o que levou o laboratório a considerar somente os resultados com as concentrações nas quais a mortalidade no controle se encontrou em níveis aceitáveis para cada modalidade de teste.

3.2.1. Exposição a Tecidos (Folhas)

Microrganismos

O objetivo do estudo, conduzido em conformidade com os princípios de Boas Práticas de Laboratório, foi investigar a influência das substâncias-teste eucalipto geneticamente modificado evento H421 e clone convencional SP530 no processo de transformação do carbono por microrganismos do solo de acordo com a norma OECD 217 (2000).

A menor concentração utilizada foi de 1,25 g/kg e a maior, correspondente a cinco vezes a menor dose, foi de 6,25 g/kg de solo. As substâncias-teste foram aplicadas a um solo arenoso (argissolo) nas concentrações de 0,0625 g/50 g de solo (menor concentração) e 0,3125 g/50 g de solo (maior concentração).

Os solos foram incubados nas condições controladas de temperatura e umidade especificadas na norma por 28 dias. Os efeitos da substância-teste na transformação do carbono foram medidos nos dias 0, 7, 14 e 28. Nesses dias, as alíquotas de solo foram suplementadas com 150 mg de glicose (500 µL de uma solução de 300 g/L de glicose) e as quantidades de CO₂ liberadas (respiração) foram determinadas através da leitura de condutividade de cada réplica, em seis tempos de amostragem (2; 4; 6; 8; 10 e 12 horas) após a adição da glicose. Amostras de solo sem a substância-teste foram utilizadas como controle do teste. Controles adicionais de condutividade sem solo foram incluídos para a determinação de 0 % de respiração (Hidróxido de sódio - NaOH - 0,2 M) e 100 % de respiração (Carbonato de sódio - Na₂CO₃ - 0,1 M). Foram utilizadas três réplicas de cada tratamento e duas réplicas foram usadas para o controle Na₂CO₃ 0,1 M.

A taxa de respiração em cada tratamento foi comparada à do controle com solo através de métodos estatísticos apropriados (Teste F e Teste t, nível de 5 % de significância) no último dia de teste (Zar, 1999). O desvio percentual em relação ao controle foi calculado, de forma a possibilitar a análise da influência das substâncias-teste H421 e SP530 no processo de transformação do carbono por microrganismos de solo. Se a diferença entre as taxas do menor tratamento (menor concentração) e o controle for igual ou inferior a 25 % para qualquer tempo de amostragem após 28 dias, a substância-teste pode ser avaliada como não tendo influência na transformação do carbono em solos. Se essa diferença for superior a 25 % no 28º dia, o teste é prolongado até que essa diferença seja inferior ou igual a 25 % ou por um período máximo de 100 dias; nesse caso, a taxa de respiração é medida a cada 14 dias.

No dia 0, a adição da substância-teste H421 no tratamento da menor concentração causou um efeito inibitório na produção de CO₂ (- 3,45 %) enquanto que efeito similar ao controle na maior concentração (0,00 %) quando comparado ao controle. No dia 7, mesmo efeito estimulatório foi observado em ambos os tratamentos

EM BRANCO

000185
2017

(+ 7,14 %) quando comparados ao controle. No dia 14, efeito estimulatório na produção de CO₂ foi observado na menor concentração (+ 1,61 %) quando comparado ao controle, enquanto que efeito similar ao controle na produção de CO₂ foi observado na maior concentração (0,00 %). No dia 28, efeito estimulatório na produção de CO₂ foi observado em ambos os tratamentos (+ 11,11 % na menor concentração e + 38,89 % na maior concentração), quando comparado ao controle. Como o desvio observado entre o solo controle suplementado com substrato orgânico e a menor concentração foi inferior a 25 % no 28º dia de teste, condição prevista na respectiva norma, o mesmo foi encerrado (ver **Figura VII.12A**).

No dia 0, adição da substância-teste SP530 no tratamento da menor concentração causou um efeito similar ao controle na produção de CO₂ (0,00 %) enquanto que efeito estimulatório na maior concentração (+ 13,79 %) quando comparado ao controle. No dia 7, efeito estimulatório foi observado em ambos os tratamentos (+ 3,57 % para a menor concentração e + 25,00 % para a maior concentração) quando comparados ao controle. No dia 14, efeito estimulatório na produção de CO₂ foi observado na menor concentração (+ 9,68 %) quando comparado ao controle, enquanto que efeito inibitório na produção de CO₂ foi observado na maior concentração (- 27,42 %). No dia 28, efeito estimulatório na produção de CO₂ foi observado em ambos os tratamentos (+ 20,37 % na menor concentração e + 38,89 % na maior concentração), quando comparado ao controle. Como o desvio observado entre o solo controle suplementado com substrato orgânico e a menor concentração foi inferior a 25 % no 28º dia de teste, este foi encerrado (ver **Figura VII.12B**).

A variação entre as três réplicas do controle com solo não tratado com a substância-teste foi menor que 15 % ao final do período de exposição para ambas as substâncias (CV = 3,21 %), de acordo com os limites da Norma OECD 217 (2000).

A partir dos resultados deste estudo, concluiu-se que, sob as condições especificadas, as substâncias-teste eucalipto evento H421 e eucalipto clone convencional SP530, quando aplicadas na menor concentração não apresentaram efeitos tóxicos nos microrganismos de solo. Na maior concentração aplicada, ambos os tratamentos apresentaram efeito similar aos 28 dias de avaliação no processo de transformação do carbono por microrganismos de solo.

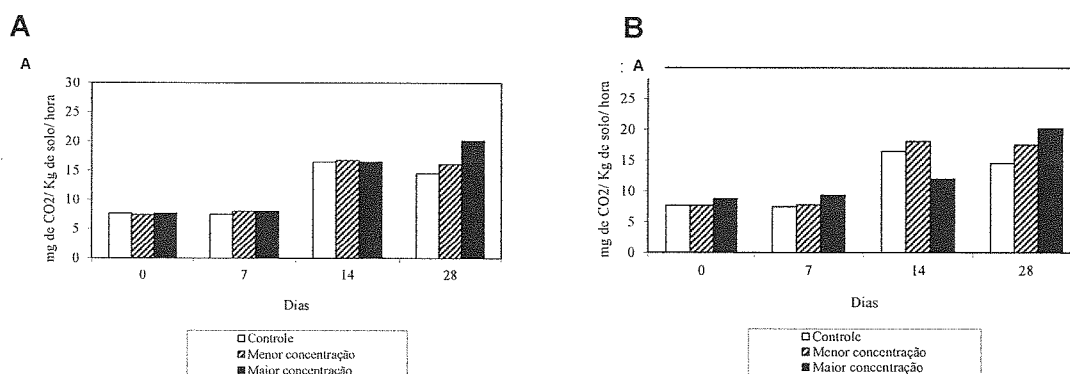
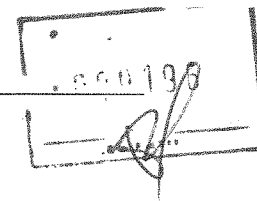


Figura VII.12. Quantidade de CO₂ liberado (mg de CO₂/kg de solo seco/hora) nos dias 0, 7, 14 e 28 no solo controle e tratamentos com as substância-teste evento H421 (A) e clone convencional SP530 (B) (menor concentração e maior concentração).



Minhoca (*Eisenia foetida*)

O objetivo do estudo, conduzido sob as diretrizes das Boas Práticas de Laboratório, foi determinar a toxicidade aguda das substâncias-teste eucalipto geneticamente modificado evento **H421** e eucalipto convencional clone **SP530** para minhocas da espécie *Eisenia foetida*, de acordo com a norma OECD 207 (1984).

Minhocas saudáveis de aproximadamente mesmo tamanho e peso, foram selecionadas da cultura e aclimatadas em solo artificial, nas mesmas condições de teste. As minhocas foram separadas, rapidamente lavadas, secas em papel absorvente macio, pesadas e distribuídas aleatoriamente nos frascos de teste. Quatro réplicas com 10 minhocas foram utilizadas por concentração-teste e controle. Foram preparadas duas concentrações de cada substância-teste e aplicada a um solo artificial composto por 10 % de esfagno triturado, 20 % de caulim e 70 % de areia peneirada. Minhocas saudáveis foram distribuídas em quatro réplicas de 10 organismos/concentração-teste assim como para o controle sem substância-teste, e expostas por um período de 14 dias. Mortalidade e comportamentos anormais foram determinados em cada período de observação (dias 7 e 14 de teste).

O teste foi realizado nas seguintes concentrações nominais de cada substância-teste: 0,00 g/kg (controle); 12,50 g/kg e 25,00 g/kg (peso seco de solo artificial). Solo artificial e volumes definidos de solução estoque (para as concentrações-teste) ou água deionizada (para o grupo controle) foram adicionados em cada réplica de forma a totalizar 750 g de meio de teste. A concentração ambiental estimada de aporte de folhas e ramos de eucalipto no solo após a colheita é de 12,5 g/kg de solo, considerando os 20 cm superficiais (37,5 t de biomassa em 1,0 ha).

Como recipientes de teste foram utilizados frascos plásticos. Estes foram cobertos com tampas plásticas perfuradas, para evitar perda de umidade e garantir as condições de teste por 14 dias. Foram consideradas mortas as minhocas que não responderam a um suave estímulo mecânico na parte anterior do corpo.

Ao final do período de exposição, a mortalidade acumulada no grupo controle e nas concentrações-teste foi calculada e os organismos sobreviventes foram pesados com objetivo de calcular a variação de biomassa durante o teste. A umidade final do solo artificial também foi determinada.

Após 14 dias de exposição, a concentração letal mediana (CL₅₀; 14d), expressa em g/kg (peso seco de solo artificial) foi estimada através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton *et al.*, 1977) e a concentração letal mediana (CL₅₀; 14d) para a substância de referência expressa em mg/kg (peso seco de solo artificial), foi estimada através do método Binomial (Stephan, 1977).

O peso médio das minhocas em cada concentração-teste e grupo controle foi calculado no início (dia 0) e final do teste (dia 14). O peso médio (g) das minhocas no início do teste está apresentado na **Tabela VII.9** e o peso médio (g) das minhocas no final do teste está apresentado na **Tabela VII.10**. Houve perda de biomassa no grupo controle e em todas as concentrações testadas. A média de perda de peso no grupo controle durante o período do estudo foi de 0,04 g.

Após 14 dias de exposição não foi observada mortalidade no grupo controle e nas concentrações testadas. A concentração letal mediana após 14 dias de exposição (CL₅₀; 14d) e respectivo intervalo de 95 % de confiança para substância de referência foram estimados através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton *et al.*,

EM BRANCO

197
[Handwritten signature]

1977). A toxicidade aguda das substâncias-teste eucalipto evento H421 e clone convencional SP530, nas condições de teste e em termos da concentração nominal, foram consideradas superiores a 25,00 mg/kg (peso seco de solo artificial). Não foram observadas diferenças significativas entre os materiais do eucalipto evento H421 e o eucalipto convencional clone SP530.

A substância de referência (cloroacetamida) apresentou uma CL₅₀; 14d de 30,84 mg/kg, com intervalo 95 % de confiança entre 28,69 e 33,16 mg/kg (peso seco de solo artificial). Este valor foi considerado dentro da faixa esperada (ISO, 1993).

Tabela VII.9. Peso médio (g) das minhocas no início do teste com as substâncias-teste eucalipto evento H421e clone convencional SP530.

Concentração Nominal (g/kg)*	Dia 0						
	Peso médio por réplica (g)				Média/réplica (g)	Total de minhocas	Média/Minhoca (g)
	A	B	C	D			
0,00 (controle)	5,9955	5,4242	5,3143	5,3744	5,527	40	0,553
12,50 (H421)	5,8166	5,4759	5,4112	5,4563	5,540	40	0,554
25,00 (H421)	5,7804	5,8160	5,2483	5,6734	5,630	40	0,563
12,50 (SP530)	5,4200	5,1442	5,9080	5,4837	5,489	40	0,549
25,00 (SP530)	5,8103	5,5800	5,2462	5,7531	5,597	40	0,560

*peso seco de solo artificial.

Tabela VII.10. Peso médio (g) das minhocas e variação da biomassa (g) no final do teste com as substâncias-teste eucalipto evento H421 e clone convencional SP530.

Concentração Nominal (g/kg)*	Dia 14							
	Peso médio por réplica (g)				Média/réplica (g)	Total de minhocas	Média/minhoca (g)	Variação/Minhoca (g)**
	A	B	C	D				
0,00 (controle)	4,6046	4,8884	5,0386	5,0694	4,900	40	0,490	-0,06
12,50 (H421)	5,6080	5,1568	5,1954	5,3810	5,335	40	0,534	-0,02
25,00 (H421)	5,1293	5,0534	4,9747	5,4342	5,148	40	0,515	-0,05
12,50 (SP530)	5,3356	4,7046	5,3210	4,9879	5,087	40	0,509	-0,04
25,00 (SP530)	5,6041	5,4869	5,1439	5,6880	5,481	40	0,548	-0,01

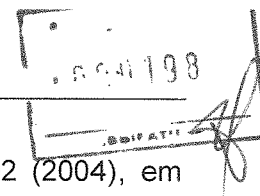
*peso seco de solo artificial.

**valores médios: dia 14 – dia 0 (g/minhoca).

Microcrustáceo - *Daphnia similis*

O estudo foi conduzido para determinar a toxicidade aguda do eucalipto geneticamente modificado evento H421 e do eucalipto controle convencional clone

EM BRANCO



SUZ SP530 para *Daphnia similis*, de acordo com a norma OECD 202 (2004), em conformidade com as diretrizes de Boas Práticas de Laboratório - BPL.

Para tanto, uma série de concentrações da substância-teste foi preparada em solução aquosa e o sistema-teste foi exposto a estas concentrações, assim como a um controle sem a substância-teste, por um período de 48 horas. O estudo foi conduzido sob condições estáticas, isto é, as soluções-teste não foram renovadas durante o período de teste. O resultado do estudo foi a determinação da "CE₅₀; 48 horas" para cada substância, que é a concentração estimada da substância-teste que causa imobilidade em 50 % dos animais expostos após 48 horas. Por ser uma substância insolúvel em água, foi preparado elutriato da amostra para realização do ensaio, de acordo com ABNT (2007). A solução estoque 100 % foi preparada pesando-se 2,5 g da amostra utilizando-se uma balança e diluindo-se para um volume de 500 mL com meio sintético MS. A mistura ficou em agitação por um período de 20 horas, para uma melhor solubilização dos potenciais agentes tóxicos presentes nas amostras. Em seguida, a mistura foi decantada por 1 hora, a parte solubilizada foi considerada a solução 100 %. A partir da solução estoque 100 % foram preparadas as demais concentrações: 50 % e 25 % de elutriato.

O teste foi realizado em triplicata, com as seguintes concentrações nominais das amostras: 0,00 (controle); 25; 50 e 100 % de elutriato de folhas. Foram utilizadas amostras de folhas das substâncias-teste (evento H421 e clone convencional SP530) de três diferentes experimentos, um deles plantado em 2007 na Fazenda Cabreúva, em Angatuba – SP, e os outros dois plantados em 2011, um na própria Fazenda Cabreúva e outro na Fazenda Fortaleza, em Araraquara – SP. Quatro réplicas foram utilizadas para cada concentração de cada substância-teste utilizada, além da testemunha (sem a substância-teste). A imobilidade dos organismos-teste foi determinada em cada tempo de observação (as 24 e 48 horas).

A **Tabela VII.11** exemplifica as observações realizadas em um dos estudos: após 48 horas de exposição, foi observado no tratamento eucalipto H421, 45% de imobilidade na concentração de 25 % de elutriato, 70 % de imobilidade na concentração 50 % de elutriato e 100 % de imobilidade na concentração 100 % de elutriato. Nenhuma anormalidade foi observada nos organismos móveis no final do teste. Na substância eucalipto convencional SP530 foi observada 45 % de imobilidade na concentração 25 % de elutriato, 60 % de imobilidade na concentração 50 % de elutriato e 100 % de imobilidade na concentração 100% de elutriato. Nenhum comportamento anormal foi observado no grupo controle.

A concentração efetiva mediana após 48 horas de exposição (CE₅₀; 48h) e respectivo intervalo de 95 % de confiança foi estimada através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton *et al.*, 1977). A média das concentrações efetivas medianas da substância-teste eucalipto H421 após 48 horas de exposição, nas condições de teste e em termos da concentração nominal, foi estimada em 33,56 % de elutriato e a média das concentrações efetivas medianas do eucalipto controle convencional clone SP530 foi estimada em 24,85 % de elutriato. Não foi encontrada diferença significativa entre as CE₅₀ médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5 %, na análise de variância (**Tabela VII.12**).

Mensalmente, a cultura de *Daphnia similis* é submetida a testes com a substância de referência (cloreto de sódio) para determinar sensibilidade e a consistência dos resultados. Para o teste realizado no período do presente estudo, a

060199
BIOFAT

concentração efetiva mediana (CE₅₀; 48h) obtida foi de 3,66 g NaCl/L, com intervalo de confiança de 95 % entre 3,05 e 4,39 g NaCl/L.

Tabela VII.11. Número de organismos imóveis de *Daphnia similis* por réplica após 24 e 48 horas e imobilidade (%) para as substâncias-teste evento H421 e controle convencional clone SP530.

Concentração nominal(%)	Número de organismos imóveis por réplica*								Imobilidade (%)	
	24 horas				48 horas				24h	48h
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4		
0,00 (controle)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25% H421	0	0	0	0	3	1	3	2	0	45
50% H421	0	0	2	2	3	3	4	4	20	70
100% H421	5	5	3	5	5	5	5	5	90	100
25% SP530	1	2	1	0	4	3	1	1	20	45
50% SP530	1	2	1	1	4	4	2	2	25	60
100% SP530	4	5	5	5	5	5	5	5	95	100

* número de organismos por réplica: 5; Rép. = Réplica.

Tabela VII.12. Resumo da análise de variância com as médias de CE₅₀ nos ensaios toxicológicos das substâncias-teste eucalipto evento H421 e eucalipto convencional clone SP530 com *Daphnia similis*.

Análise de variância CE₅₀ Elutriato - %

GL resíduo	2
F tratamentos	0,35
Média geral	29,21
Desvio-padrão	17,94
DMS (5%)	63,02
CV (%)	61,43

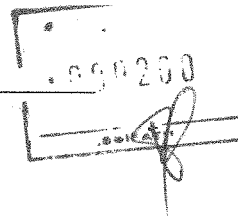
Teste de Tukey a 5%:

H421	33,56 a
SP530	24,85 a

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

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

EM BRANCO



Peixes – *Danio rerio*

O estudo foi conduzido para determinar a toxicidade aguda do eucalipto geneticamente modificado evento H421 e eucalipto controle convencional clone SUZ SP530 para peixes da espécie *Danio rerio*, de acordo com a norma OECD 203 (1992) e em conformidade com as diretrizes de Boas Práticas de Laboratório - BPL.

Para tanto, uma série de concentrações das substâncias-teste foi preparada em solução aquosa e o sistema-teste foi exposto a estas concentrações, assim como a uma testemunha sem a substância-teste, por um período de 96 horas. O estudo foi conduzido em condições estáticas, isto é, as soluções-teste não foram renovadas durante o período de teste. O resultado do estudo foi a determinação da "CL₅₀; 96 horas", que é a concentração da substância-teste que causa mortalidade a 50 % dos animais expostos. Por ser uma substância insolúvel em água, foi preparado um elutriato das folhas de eucalipto, para realização do ensaio de acordo com ABNT (2007). A solução estoque 100 % de elutriato foi preparada pesando-se 20 g da amostra utilizando-se uma balança e diluindo-se para um volume de 4000 mL com água mole reconstituída. A mistura ficou em agitação por um período de 20 horas, para uma melhor solubilização dos potenciais agentes tóxicos presentes nas amostras. Em seguida, a mistura foi decantada por 1 hora, a parte solubilizada foi considerada a solução 100 %. A partir da solução estoque 100 % foram preparadas as demais concentrações: 50 %, 25 % e 12,5 % de elutriato.

O teste foi realizado em triplicata, com as seguintes concentrações nominais das amostras: 0,0 (controle); 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 % de elutriato. Foram utilizadas amostras de folhas das substâncias-teste (evento H421 e clone convencional SP530) de três diferentes experimentos, um deles plantado em 2007 na Fazenda Cabreúva, em Angatuba – SP, e os outros dois plantados em 2011, um na própria Fazenda Cabreúva e outro na Fazenda Fortaleza, em Araraquara – SP. Duas réplicas com dez animais foram utilizadas para cada concentração, de cada substância, e testemunha sem substância-teste. Mortalidade e comportamento anormal foram determinados em cada tempo de observação (a 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas).

A concentração letal mediana após 96 horas de exposição (CL₅₀; 96h) e respectivo intervalo de 95 % de confiança foi estimada através do método Spearman-Kärber modificado (Hamilton *et al.*, 1977). As curvas de mortalidade em função da concentração para o eucalipto evento H421 e clone convencional SP530 apresentam desenhos semelhantes (**Figuras VII.13 e VII.14**). Não foram observadas diferenças de peso e tamanho dos peixes. A análise de variância com as médias das CL₅₀ obtidas não mostram diferença significativa entre o eucalipto evento H421 e o eucalipto convencional clone SP530 (**Tabela VII.13**).

EM BRANCO

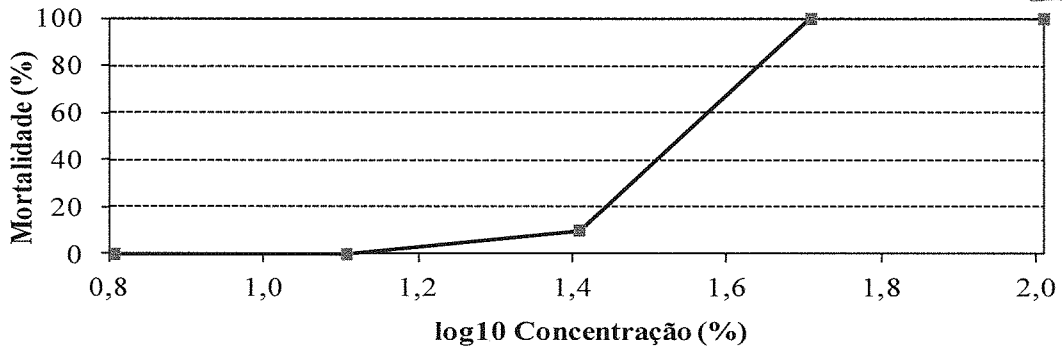
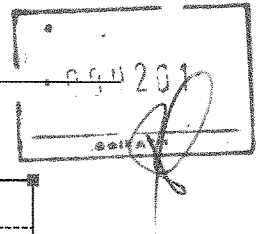


Figura VII.13. Curva concentração-mortalidade após 96 horas de exposição para a substância-teste eucalipto evento H421 - TR 05.

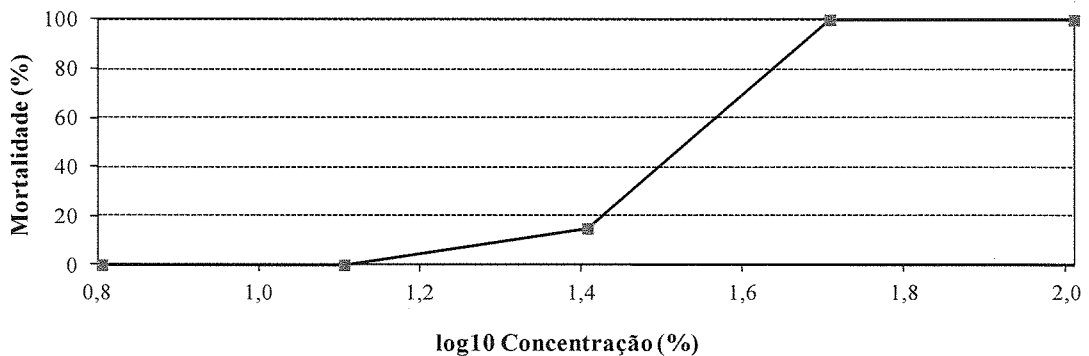


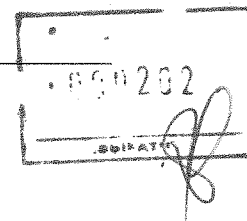
Figura VII.14. Curva concentração-mortalidade após 96 horas de exposição para a substância-teste clone convencional SP530 - TR 06.

Tabela VII.13. Resumo da análise de variância com a CL₅₀ média determinada para as substâncias-teste eucalipto evento H421 e eucalipto convencional clone SP530 em teste toxicológico com peixes da espécie *Danio rerio*.

Análise de variância	CL ₅₀ Elutriato
GL resíduo	2
F tratamentos	3,34
Média geral	37,31
Desvio-padrão	8,30
DMS (5%)	29,17
CV (%)	22,25
Teste de Tukey a 5%:	
H421	31,12 a
SP530	43,50 a

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

Letras iguais indicam que, no nível de significância de 5 %, não há diferença entre as médias.



3.2.2. Exposição a Pólen

Para o cálculo dos aportes de pólen em água, os dados disponíveis, ainda referentes a milho, indicam uma entrada de 0,1 a 1,0 g m⁻² de canal (Rosi-Marshall, 2007). Para os estudos com organismos indicadores aquáticos, utilizou-se uma taxa média diária de aporte aéreo de pólen de 0,055 g m² até entre duas a três vezes maior que a maior taxa de aporte observada (1,0 g m²) de 2,75 g m².

Peixes – *Danio rerio*

O presente estudo foi conduzido em conformidade com os princípios das Boas Práticas de Laboratório para determinar a toxicidade aguda da substância-teste pólen do eucalipto geneticamente modificado evento H421 e do clone convencional SP530 para peixes da espécie *Danio rerio*, de acordo com a norma OECD 203 (1992).

Para tanto, uma série de concentrações da substância-teste foi preparada em solução aquosa e o sistema-teste foi exposto a estas concentrações assim como a um controle sem a substância-teste por um período de 96 horas. O estudo foi conduzido em condições estáticas, isto é, as soluções-teste não foram renovadas durante o período de teste. O resultado do estudo foi a determinação da CL₅₀; 96 horas, a qual é a concentração da substância-teste que causa mortalidade a 50 % dos animais expostos.

Por se tratar de uma substância insolúvel em água, foi preparada a Fração Acomodada em Água (FAA) das amostras de pólen coletadas para realização do ensaio, de acordo com NBR 15469 (ABNT, 2007).

O teste foi realizado com as seguintes concentrações nominais das amostras: 0,00 (controle); 11,25; 22,50 e 45,00 mg/L de FAA. As concentrações nominais foram definidas com base na informação do aporte anual de pólen de milho em corpos d'água que variam de 0,1 a 1 g/m² de canal (Rosi-Marshall, *et al.*, 2007). Neste estudo foi utilizado como maior concentração 2,75 g/m² que corresponde a 2,75 vezes o maior valor de aporte. Para a condução do presente estudo com pólen de eucalipto, a maior concentração-teste (220,0 mg/L) correspondente a concentração de 2,75 g/m² foi calculada considerando o tamanho da boca do frasco-teste (Becker de 3.000 mL), com diâmetro de 14 cm. Duas réplicas com dez animais foram utilizadas para cada concentração e controle sem a substância-teste. Mortalidade e comportamento anormal foram determinados em cada tempo de observação (3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas). Após 96 horas, nenhuma mortalidade foi observada nas concentrações testadas e no grupo controle. Após 96 horas de exposição, nenhum comportamento anormal foi observado nos peixes expostos às concentrações e no grupo controle (**Tabela VII.14**).

A **Tabela VII.15** apresenta os valores médios e desvio padrão de comprimento e peso dos peixes expostos após 96 horas de teste, onde não podem ser observadas diferenças significativas.

A conclusão é de que a concentração letal mediana da substância-teste evento H421 e clone convencional SP530, após 96 horas de exposição (CL₅₀; 96 h), nas condições de teste e em termos da concentração nominal, foi, para ambas, considerada superior a 45,00 mg/L de FAA.

EN BRANCO

Tabela VII.14. Mortalidade acumulada dos peixes *Danio rerio* após 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição, mortalidade (%) e comportamento anormal após 96 horas para a substância-teste evento H421 e clone convencional SP530.

Concentração nominal (mg/L FAA)	R	Número de peixes mortos durante o período de teste*						Mortalidade (%)	Comportamento (96h)
		3h	6h	24h	48h	72h	96h		
Controle	A	0	0	0	0	0	0	0	100% A
	B	0	0	0	0	0	0	0	100% A
11,25 (H421)	A	0	0	0	0	0	0	0	100% A
	B	0	0	0	0	0	0	0	100% A
22,50 (H421)	A	0	0	0	0	0	0	0	100% A
	B	0	0	0	0	0	0	0	100% A
45,00 (H421)	A	0	0	0	0	0	0	0	100% A
	B	0	0	0	0	0	0	0	100% A
11,25 (SP530)	A	0	0	0	0	0	0	0	100% A
	B	0	0	0	0	0	0	0	100% A
22,50 (SP530)	A	0	0	0	0	0	0	0	100% A
	B	0	0	0	0	0	0	0	100% A
45,00 (SP530)	A	0	0	0	0	0	0	0	100% A
	B	0	0	0	0	0	0	0	100% A

R= Réplica

* Número total de peixes por concentração: 10.

Código	Comportamento	Código	Comportamento
A	Normal	G	Ventre dilatado
B	Natação irregular	H	Peixe agonizando
C	Peixe estático	I	Natação lenta
D	Peixe agitado	J	Peixe deformado
E	Pontos avermelhados no corpo	K	Peixe no fundo
F	Coloração alterada	L	Peixe na superfície

EM BRANCO

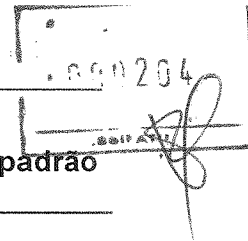


Tabela VII.15. Dados de comprimento e peso: valores médios e desvio padrão dos peixes expostos após 96 horas de teste.

Concentração nominal (mg/L FAA)	R	Comprimento total (cm)		Peso (g)	
		M	DP	M	DP
Controle	A	1,5	0,1	0,051	0,018
	B	1,5	0,1	0,049	0,011
11,25 (H421)	A	1,5	0,2	0,042	0,020
	B	1,6	0,1	0,046	0,017
22,50 (H421)	A	1,5	0,2	0,040	0,025
	B	1,5	0,2	0,065	0,028
45,00 (H421)	A	1,6	0,2	0,051	0,018
	B	1,6	0,1	0,056	0,022
11,25 (SP530)	A	1,6	0,2	0,066	0,034
	B	1,5	0,1	0,043	0,010
22,50 (SP530)	A	1,6	0,2	0,056	0,017
	B	1,6	0,2	0,065	0,028
45,00 (SP530)	A	1,5	0,2	0,057	0,026
	B	1,5	0,2	0,056	0,022
TOTAL		1,5	0,2	0,053	0,021

R= Réplica; M = média; DP = desvio padrão.

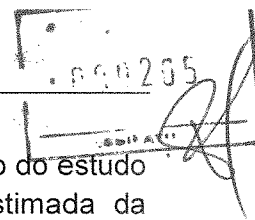
Microcrustáceo – *Daphnia similis*

O estudo foi conduzido em conformidade com os princípios das Boas Práticas de Laboratório para determinar a toxicidade aguda das substâncias-teste pólen de eucalipto evento H421 e de eucalipto convencional clone SP530 para *Daphnia similis*, de acordo com a norma OECD 202 (2004).

Para tanto, uma série de concentrações das substâncias-teste foi preparada em solução aquosa e o sistema-teste foi exposto a estas concentrações, assim como a um controle sem as substâncias-teste, por um período de 48 horas. As concentrações nominais foram definidas com base na informação do aporte anual de pólen de milho em corpos d'água, que variaram de 0,1 a 1 g/m² de canal (Rosi-Marshall, *et al.*, 2007). Neste estudo foi utilizado como maior concentração 2,75 g/m² que corresponde a 2,75 vezes o maior valor de aporte. Para a condução do presente estudo com pólen de eucalipto, a maior concentração-teste (220,0 mg/L) correspondente à concentração de 2,75 g/m², foi calculada considerando-se o tamanho da boca do frasco-teste (Becker de 30 mL), que apresenta diâmetro de 3,5 cm.

Jovens saudáveis com menos de 24 horas de idade foram selecionados da cultura isolada antes do início do teste. Foram utilizadas quatro réplicas com cinco organismos cada para as concentrações-teste e controle. Cada grupo foi colocado em béquer com aproximadamente 25 mL de solução-teste ou água de diluição (controle). O teste foi incubado em ambiente escuro e os animais não foram alimentados durante o período do teste. O estudo foi conduzido sob condições estáticas, isto é, as

EN BRANCO



soluções-teste não foram renovadas durante o período de teste. O resultado do estudo foi a determinação da "CE₅₀; 48 horas", a qual é a concentração estimada da substância-teste que causa imobilidade a 50 % dos animais expostos após 48 horas do início da exposição.

Por se tratar de uma substância insolúvel em água, foi preparada a Fração Acomodada em Água (FAA) a partir das amostras de pólen coletadas para a realização do ensaio, de acordo com a NBR 15469 (ABNT, 2007).

O teste foi realizado com as seguintes concentrações nominais das amostras: 0,00 (controle); 55,00; 110,0 e 220,0 mg/L de FAA. Quatro réplicas foram utilizadas para cada concentração e controle sem a substância-teste. A imobilidade dos organismos-teste foi determinada em cada tempo de observação (a 24 e 48 horas). Após 48 horas de exposição, não foi observada imobilidade nas concentrações testadas e no grupo controle. Nenhuma anormalidade foi observada nos organismos móveis no final do teste.

Após 48 horas de exposição, não foi observada 50 % de imobilidade em nenhuma concentração testada, para qualquer uma das substâncias-teste. Portanto, concentração efetiva mediana da substância-teste eucalipto evento H421 e clone convencional SP530 após 48 horas de exposição (CE₅₀; 48h), nas condições de teste e em termos da concentração nominal, foi considerada superior a 220,0 mg/L de FAA.

Mensalmente, a cultura de *Daphnia similis* é submetida a testes com a substância de referência (cloreto de sódio) para determinar a sensibilidade e a consistência dos resultados. Para o teste realizado no período do presente estudo, a concentração efetiva mediana (CE₅₀; 48h) obtida foi de 2,03 g NaCl/L, com intervalo de confiança de 95 % entre 1,66 e 2,49 g NaCl/L.

A **Tabela VII.16** apresenta o número de organismos imóveis após 24 e 48 horas de exposição para a substância-teste eucalipto evento H421 e clone convencional SP530. Após 48 horas de exposição, não foi observada imobilidade nas concentrações testadas e no grupo controle. Nenhuma anormalidade foi observada nos organismos móveis no final do teste. A **Tabela VII.17** mostra os valores de pH e oxigênio dissolvido nas soluções de incubação dos animais a 0 e 48 horas de estudo, onde pode-se observar que não há diferença significativa entre os tratamentos.

Após 48 horas de exposição, não foi observada 50 % de imobilidade em nenhuma concentração testada. Portanto, a concentração efetiva mediana das substâncias-teste eucalipto evento H421 e clone convencional SP530 após 48 horas de exposição (CE₅₀; 48h), nas condições de teste e em termos da concentração nominal, foi considerada superior a 220,0 mg/L de FAA.

EM BRANCO

09/02/2016
BIOFATE

Tabela VII.16. Número de organismos imóveis por réplica após 24 e 48 horas e imobilidade (%) para as substâncias-teste eucalipto evento H421 e clone convencional SP530.

Concentração nominal (mg/L FAA)	Número de organismos imóveis por réplica*								Imobilidade (%)	
	24 horas				48 horas				24h	48h
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4		
0,00 (controle)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55,00 (H421)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
110,0 (H421)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
220,0 (H421)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55,00 (SP530)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
110,0 (SP530)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
220,0 (SP530)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* número de organismos por réplica: 5; Rép. = Réplica.

Tabela VII.17. Valores de pH e oxigênio dissolvido das soluções em 0 e 48 horas e dureza total inicial.

Concentração nominal (mg/L FAA)	pH		Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	I	F	I	F	
0,00 (controle)	7,35	7,10	7,44	7,69	46,5
55,00 (H421)	7,12	7,05	7,29	7,64	-
110,0 (H421)	7,07	7,01	7,25	7,43	-
220,0 (H421)	7,03	7,03	7,34	7,18	-
55,00 (SP530)	7,08	7,08	7,38	7,51	-
110,0 (SP530)	7,12	7,10	7,37	7,49	-
220,0 (SP530)	7,09	7,17	7,28	7,45	-

I = Inicial; F = Final.

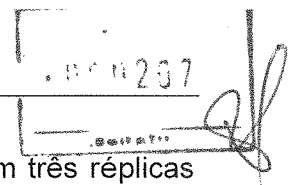
3.3. ENSAIOS DE TOXICIDADE EM ABELHAS

Abelhas melíferas – *Apis mellifera*

O objetivo do estudo, conduzido em conformidade aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório, foi determinar a toxicidade aguda oral da substância-teste bolotas de pólen de eucalipto originado de colmeias instaladas em área experimental de eucalipto geneticamente modificado (pólen GM), dentre os quais o evento H421, e bolotas de pólen de colmeias em área com eucalipto convencional (pólen convencional) para abelhas (*Apis mellifera*) de acordo com a norma OPPTS Harmonized Test Guidelines. Honey Bee testing, Tier I 885.4380, 2p., 1996.

O teste foi realizado com as seguintes doses nominais orais da substância-teste: 0,00 µg bolo de pólen/abelha (controle mel); 0,00 µg bolo de pólen/abelha (controle mel + açúcar); 100,0 µg bolo de pólen/abelha (pólen GM) e 100,0 µg bolo de

EM BRANCO



pólen/abelha (pólen convencional). Noventa abelhas por tratamento, em três réplicas de 30 animais cada, foram utilizadas.

Um teste com a substância de referência (dimetoato técnico) com o mesmo lote de abelhas utilizado no teste foi realizado para verificar a sensibilidade do sistema-teste. A substância de referência foi testada nas seguintes doses nominais orais: 0,00 µg i.a./abelha (controle); 0,075 µg i.a./abelha; 0,150 µg i.a./abelha, 0,300 µg i.a./abelha e 0,600 µg i.a./abelha.

As abelhas foram deixadas em jejum por aproximadamente 2 horas antes do teste e após esse período foram anestesiadas com gás nitrogênio (N₂). Foram selecionadas trinta abelhas operárias jovens adultas, escolhidas aleatoriamente, por réplica. Três réplicas foram testadas por dose. Após o período de dormência, foram oferecidos às abelhas recipientes contendo 80 % de substância-teste: 20 % de mel, durante 4 horas. O grupo controle foi exposto somente ao mel sem a substância-teste e um grupo controle adicional foi exposto ao mel + açúcar. Ao final do período de exposição de 4 horas, a quantidade de substância-teste consumida foi determinada por pesagem dos recipientes com alimento.

Avaliações de mortalidade e comportamento anormal foram realizadas 4, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início da exposição com a substância-teste.

Como a mortalidade aumentou mais que 20 % após 120 horas, o estudo com substância-teste foi encerrado com 96 horas, com avaliações a cada 24 horas. A mortalidade no controle não excedeu 20 % durante este período. Avaliações de mortalidade e comportamento anormal foram realizadas em 4 e 24 horas após o início da exposição com substância de referência e sem a substância de referência (controle).

Após 96 horas de teste com a substância-teste pólen GM e pólen convencional, foi observada 100 % de mortalidade nas doses 100,0 µg bolo de pólen/abelha (pólen GM) e 100,0 µg bolo de pólen/abelha (pólen convencional). Foram observados 19 % de mortalidade no controle (mel) e 27 % de mortalidade no controle adicional (mel + açúcar). As doses 100,0 µg bolo de pólen/abelha (pólen GM) e 100,0 µg bolo de pólen/abelha (pólen convencional) apresentaram abelhas com lentidão e agonizando após as primeiras 24 horas. Comportamento anormal como lentidão foi observado nas abelhas do grupo controle, em 96 horas de exposição.

Foi observado efeito tóxico significativo da substância-teste sobre os animais expostos às doses 100,0 µg bolo de pólen/abelha (GM) e 100,0 µg bolo de pólen/abelha (Convencional) quando comparado com o controle (mel) (**Tabela VII.18**) através da Prova Exata de Fisher (Zar, 1999). A dose letal mediana oral da substância-teste pólen GM e pólen convencional (DL₅₀; 96h) nas condições de teste e em termos da dose nominal, foi considerada inferior a 100,0 µg bolo de pólen/abelha. Ao final do período de exposição, houve perda de peso nos animais expostos às doses de 100,0 µg bolo de pólen/abelha (GM), de 100,0 µg bolo de pólen/abelha (Convencional) e do controle (mel + açúcar). Houve ganho de peso nos animais do controle (mel) após 96 horas de exposição.

EMBRANCO

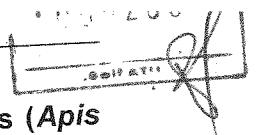


Tabela VII.18. Resultados do teste de toxicidade aguda oral com abelhas (*Apis mellifera*) para as substâncias-teste eucalipto evento H421 e clone convencional SP530.

Dose nominal (μg /abelha)	Observação (horas)	Nº de animais mortos (M)/total (T)						Mortalidade (%)	Comportamento ¹ (96h)
		Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3			
		M	T	M	T	M	T		
0,000 (controle mel)	4	0	30	0	30	0	30	0	-
	24	0	30	1	30	3	30	4	-
	48	0	30	1	30	8	30	10	-
	72	2	30	2	30	8	30	13	-
	96	6	30	3	30	8	30	19	49A; 24C
0,000 (controle mel + açúcar)	4	0	30	0	30	0	30	0	-
	24	1	30	1	30	2	30	4	-
	48	3	30	3	30	4	30	11	-
	72	6	30	4	30	4	30	16	-
	96	5	30	9	30	10	30	27	40A; 26C
100,0 (pólen GM)	4	0	30	0	30	0	30	0	-
	24	7	30	12	30	8	30	30	-
	48	24	30	29	30	27	30	89	-
	72	30	30	30	30	30	30	100	-
	96	30	30	30	30	30	30	100	-
100,0 (pólen convencional)	4	0	30	0	30	0	30	0	-
	24	6	30	9	30	7	30	24	-
	48	29	30	29	30	29	30	97	-
	72	30	30	30	30	30	30	100	-
	96	30	30	30	30	30	30	100	-

¹Comportamento: A= normal; B= agitação; C= lentidão; D= agonizante; E= agrupado.

O resultado do teste com a substância de referência (dimetoato técnico) mostrou uma DL_{50} ; 24 h de 0,12 μg i.a./abelha, com intervalo de 95 % de confiança entre 0,11 e 0,14 μg i.a./abelha. A mortalidade de 19 % no controle do teste EMBRAPA (1999), com a substância-teste pólen GM e pólen convencional após 96 horas e a DL_{50} da substância de referência (OECD 2013, 1998), dimetoato técnico, estiveram dentro da faixa esperada. O estudo foi, desta forma, considerado válido.

EM BRANCO