

# Bacillus thuringiensis

Formulações e Plantas Transgênicas

## Deise Maria Fontana Capalbo

Dra em Engenharia de Alimentos, pesquisadora,  
Embrapa Meio Ambiente  
deise@cnpma.embrapa.br

## Gislayne Trindade Vilas-Bôas

Dra em Microbiologia, Universidade Estadual de  
Londrina  
gvboas@uel.br

## Olívia M. Nagy Arantes

Dra em Agronomia, Professor Adjunto  
Universidade Estadual de Londrina  
oarantes@uel.br

## Marise T. Suzuki

Mestre em Biotecnologia, Doutoranda de  
Biotecnologia pela USP/SP  
Bolsista Capes, Embrapa Meio Ambiente  
marisets@cnpma.embrapa.br

O controle de insetos-praga de lavouras nocivos ao homem tem sido feito com inseticidas químicos desde o início da década de 40, no século passado. Além do problema de poluição ambiental gerados, eles se mostraram tóxicos e sem especificidade, atingindo também os insetos benéficos e induzindo casos de resistência nos insetos praga. Outros compostos químicos foram posteriormente elaborados, mas o seu emprego intensivo, tanto na agricultura quanto na saúde pública, resultou em novos casos de resistência e mesmo em resistência cruzada. Além do problema da resistência, com conseqüente redução da efetividade do controle, o uso de inseticidas químicos também levou à redução da biodiversidade nas áreas tratadas, à contaminação de alimentos, do solo e da água.

A agricultura sustentável do século XXI exige, cada vez mais, intervenções alternativas para o controle e manejo de insetos que sejam ambientalmente seguras e que reduzam o contato humano com os pesticidas químicos sintéticos. Como opção podem ser utilizados microrganismos entomopatogênicos, incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários, com vantagens numerosas, como por exemplo: a segurança para seres humanos e outros organismos-não-alvo, a redução de resíduos de pesticidas nos alimentos, o aumento da atividade de outros ini-

migos naturais e a recuperação da biodiversidade nos ecossistemas tratados.

Nos anos que se seguiram à sua descoberta, no início do século XX, *Bacillus thuringiensis* (Bt) recebeu pouca atenção dos microbiologistas e entomologistas. Entretanto, após a descoberta de sua atividade entomopatogênica, ele passou a ser estudado por enorme quantidade de cientistas das mais diversas disciplinas, que exploraram seus segredos em nível molecular, fisiológico e ecológico. Hoje, Bt é o inseticida microbiano mais bem-sucedido, aplicado na proteção de grãos, florestas e no combate a vetores de doenças aos humanos.

A atividade entomopatogênica desta bactéria é decorrente da produção de cristais protéicos em concomitância com o processo de esporulação (figura 1). Esses cristais são formados por polipeptídios conhecidos como proteínas Cry que apresentam propriedades entomopatogênicas frente a insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Dictyoptera, Orthoptera, Mallophaga, além de nematóides (Strongylida, Tylenchida), protozoários (Diplomonadida) e ácaros (Acari).

O avanço das pesquisas com esta bactéria incentivou a busca de novos isolados com atividade tóxica até então desconhecida àqueles insetos, bem como a obtenção, por engenharia genética, de linhagens com atividade bioinseticida frente a

**Quadro 1.** Pesquisa desenvolvida com *Bacillus thuringiensis* no setor privado nos anos 1980

Período	Empresa	Cepas não modificadas	Cepas melhoradas	Plantas recombinantes	Aplicação mediada por microrganismos
Antes de 1980	Abbot Laboratories	+			
	Biochem	+			
	Zoecon	+			
	Duphar	+			
Após 1980	Abbot	+	+		
	Solvay/Duphar	+	+		
	Zoecon/Sandoz	+	+	+	
	Novo	+	+		
	Ciba-Geigy	+	+		
	ICI	+	+	+	
	Sumitomo	+	+		
	Dow Elanco	+	+		
	Ecogen	+	+		
	Mycogen	+	+		+
	Monsanto			+	+
	Rohm and Haas			+	
	Plant Genetic Systems			+	
	Agracetus			+	
	Calgene			+	
	Sungene Techn. Inc.			+	
Agrigenetics				+	
Crop Genetics Intern.				+	

Fonte: Adaptado de Frankenhuizen (1993)

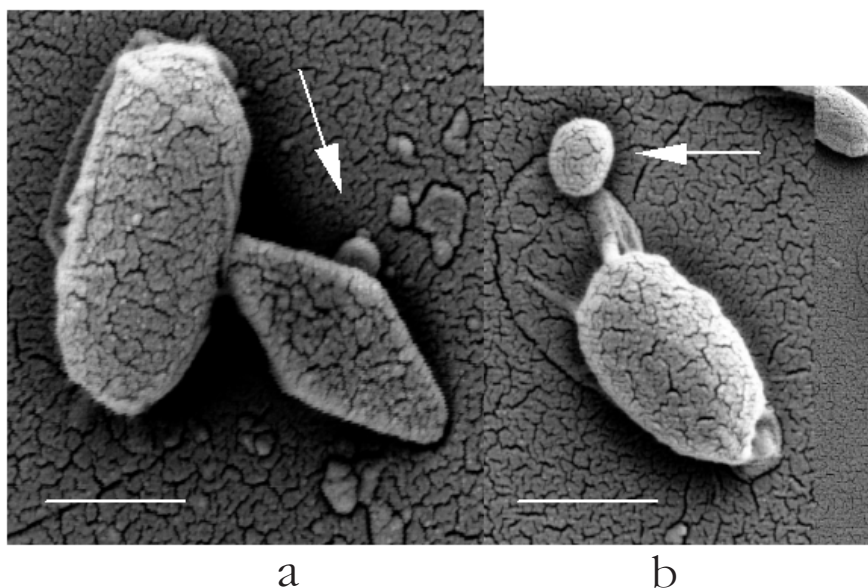
um espectro maior de insetos alvo. Esses avanços coincidiram com uma mudança decisiva no modo como a sociedade, e em especial os órgãos regulamentadores, perceberam as conseqüências ambientais do uso intensivo de pesticidas químicos, em especial o desenvolvimento de resistência dos insetos aos princípios ativos. Esses fatos estimularam inúmeras empresas voltadas à produção de agrotóxicos e à biotecnologia, a iniciarem ou fortalecerem suas linhas de pesquisa e desenvolvimento com Bt (Quadro 1), bem como a lançarem no mercado inúmeros produtos registrados à base desta bactéria.

O desenvolvimento de novos produtos para o controle biológico foi possível, especialmente, devido à atividade entomopatogênica desta bactéria estar relacionada à formação da proteína Cry, codificada por um único gene *cry*, o que facilita a manipulação de diferentes genes *cry* em processos biotecnológicos. Assim, no final do século XX houve uma diversificação das estratégias de sua utilização no controle biológico: maior produção de toxinas; aumento do espectro de ação por novas variedades de *B. thuringiensis*; introdução de genes *cry* em diferentes microrganismos e plantas transgênicas.

Foi assim contornado o limitado espectro de controle e obtidas formas mais eficazes e direcionadas de aplicação, dando espaço para novos avanços na área de genética de Bt, explorando-se ainda mais as bases de sua toxicidade seletiva e especificidade.

### Genes *cry* e proteínas Cry

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem de Bt são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma apresenta. Uma linhagem de *B. thuringiensis* pode conter uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou de diferentes genes cujos produtos formarão o mesmo cristal. A loca-



**Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura de esporos e cristais (setas) de *Bacillus thuringiensis*. a) cristais com formato bipiramidal e b) cristais com formato esférico. Barras: 1 µm.

Fotografias de Marise T. Suzuki (CNPMA/EMBRAPA).

lização preferencial em plasmídios conjugativos, bem como a freqüente associação a elementos genéticos móveis, determina a grande diversidade destes genes e a conseqüente ocorrência de linhagens contendo diferentes combinações deles, o que resulta em perfis de toxicidade distintos.

Todos os avanços no conhecimento dos genes *cry* permitiram ainda a construção de sondas específicas para a seleção de linhagens por meio de análise de hibridação, em razão da presença de seqüências de nucleotídios conhecidas. Em 1998, Crickmore e colaboradores propuseram uma classificação das proteínas Cry, baseada somente na seqüência de aminoácidos, não levando em consideração o perfil de toxicidade. Atualmente são descritos mais de 250 genes diferentes, enumerados por algarismos arábicos contendo 44 classes com subdivisões (*cry1* a *cry44*). As atualizações são freqüentes e podem ser acompanhadas pelo site: [http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index).

### **Modo de ação e estrutura das proteínas Cry**

Na forma como são sintetizadas, as proteínas Cry apresentam-se como protoxinas sem ação entomopatogênica, necessitando ser ativadas para o desencadeamento de seus efeitos tóxicos. Sua ação ocorre por via oral, seguindo-se uma série de passos. Ao serem ingeridas por um inseto suscetível, as protoxinas são solubilizadas no ambiente alcalino do intestino dele (pH ~ 10) e, em seguida, processadas por proteases específicas. Os produtos ativos das proteínas Cry resultantes de todos esses processos ligam-se de maneira irreversível a receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto, levando à formação de poros inespecíficos ou canais iônicos, que alteram a permeabilidade das células. Essa alteração leva a uma lise celular e à ruptura da integridade intestinal, com conseqüente morte da larva.

As proteínas Cry apresentam massas moleculares que variam de 40 a 140 kDa, possuindo duas regiões distintas: uma porção amino-terminal, normalmente variável e associada à toxicidade, e uma porção carboxi-terminal, mais conservada entre as proteínas, associada geralmente à formação do cristal. Nos insetos pertencentes à ordem Lepidoptera, a intoxicação manifesta-se por paralisação imediata do tubo digestivo e das peças bucais, levando à lise celular e interrupção da alimentação. Esses sintomas são seguidos por ruptura na integridade do intestino, inanição e posterior septicemia, levando o inseto à morte.

### **Ecologia de *B. thuringiensis***

Em todo o mundo, muitos programas de isolamento de *B. thuringiensis* têm encontrado este microrganismo distribuído em ampla gama de ambientes. Linhagens têm sido isoladas principalmente a partir de amostras de solo, de insetos vivos ou mortos e de grãos estocados, bem como de fontes alternativas, como o filoplano de espécies vegetais e amostras de águas de rios e lagos. No entanto, a sua distribuição e suas relações ecológicas permanecem ainda em discussão. Sabe-se que seus esporos podem persistir no solo por diversos anos, contudo, segundo estudos recentes, *B. thuringiensis* não tem a capacidade de se multiplicar nem no solo nem na água. Diversos dados evidenciam que o inseto é o único ambiente onde ocorre multiplicação e efetiva troca de material genético entre linhagens de *B. thuringiensis* (Suzuki et al. 2004; Vilas-Bôas et al., 1998). Isso explica o fato de nunca ter sido descrita epizootia no caso de *B. thuringiensis* e corrobora a segurança dos produtos à base desta bactéria.

### **Produtos formulados à base de *B. thuringiensis***

Formulações comerciais basea-

das em *B. thuringiensis* são compostas por uma mistura de células, esporos e cristais, que são formados por proteínas Cry. Estas proteínas são consideradas ambientalmente seguras por apresentarem um modo de ação extremamente específico e serem rapidamente biodegradadas em ambientes naturais como o solo. Os mecanismos envolvidos no modo de ação de Bt garantem de certa forma sua segurança especialmente ao homem e insetos benéficos. Em adição, extensivos estudos em laboratório são requeridos para a liberação de novos produtos pela Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA-EUA) e outras autoridades regulatórias de vários países, incluindo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) no Brasil. O Quadro 2 mostra a disponibilidade de produtos à base de Bt, no Brasil, até dezembro de 2003, registrados nos órgãos federais competentes.

A escolha de um produto para a implantação de programas de controle de insetos deve levar em conta, entre outras características, a eficácia e a persistência da atividade bioinseticida. No entanto, alguns produtos têm demonstrado baixa persistência e/ou atividade no campo, o que leva a aplicações recorrentes, dependendo do produto e do inseto-alvo. Outros produtos não atingem determinadas regiões da planta, como raízes, colmo e botão floral, que são pontos estratégicos para o controle de várias pragas suscetíveis a *B. thuringiensis*. Assim, houve a necessidade do desenvolvimento de produtos biotecnológicos à base de proteínas Cry, visando preencher as lacunas apresentadas pelos programas de controle de insetos baseados em Bt.

Diferentes produtos biotecnológicos foram lançados no mercado, como o bioinseticida Raven® da Ecogen, produzido a partir de uma linhagem de *B. thuringiensis* onde foram inseridos genes *cry*, responsá-

**Quadro 2.** Biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* registrados no Brasil até 2003

Órgão de Registro	Empresa produtora	Nome comercial	Ingrediente ativo	Organismo alvo	<sup>1</sup> Classe toxicológica	<sup>2</sup> Ano de registro
MAPA <sup>3</sup>	Sumitomo (anteriormente Abbott Lab.)	Dipel	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1	Lepidópteros	IV <sup>4,5</sup>	1991
IBAMA <sup>4</sup>	Sumitomo	Dipel F	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1	<i>Thyrinteina arnobia</i>	IV <sup>4,5</sup>	1991
MAPA	Sumitomo	Dipel Técnico	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1	Lepidópteros	IV <sup>4,5</sup>	1981
MAPA	Sumitomo	Dipel PM <sup>6</sup>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1	Lepidópteros	IV <sup>4,5</sup>	1989
MAPA	Agri-control	Bac-control PM	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , 3a, 3b	Lepidópteros	IV <sup>4,5</sup>	1987
MAPA	Novartis S.A. (antiga Ciba-Geigy)	Agree	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> , GC 91	Lepidópteros	III5IV <sup>4</sup>	1995
IBAMA	Novartis S.A.	AgreE	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> , GC 91	<i>T. arnobia</i>	III5IV <sup>4</sup>	1995
MAPA	Milenia (antiga Geratec)	Bactur PM	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , H-3a, 3b	<i>A. gemmatilis</i>	III5IV <sup>4</sup>	1996
MAPA	Iharabras Novartis S.A. (antiga Sandoz)	Thuricide	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , HD-1	Lepidópteros	IV <sup>4,5</sup>	1991
IBAMA	Iharabras / Novartis S.A.	Thuricide PM	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	Lepidópteros	IV <sup>4,5</sup>	1995
ANVISA	Novartis S.A.	Teknar	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	<i>Culex</i> , <i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> , Simulídeos	IV	1989
ANVISA	Sumitomo	Spherico	<i>B. sphaericus</i>	<i>Aedes aegypti</i> Culicídeos	IV	1995
MAPA	Agrevo Bayer Crop Science	Ecotech Pro	<i>B. thuringiensis</i>		III5IV <sup>4</sup>	1998
MAPA	Sumitomo	Xentari	<i>B. thuringiensis</i>		II5IV <sup>4</sup>	1998
ANVISA	Sumitomo	Vectolex - G	<i>B. sphaericus</i>	Domissanitário	Domissanitário <sup>7</sup>	1999

<sup>1</sup>Classe toxicológica: III = medianamente tóxico, IV = pouco tóxico

<sup>2</sup>Ano em que o registro foi autorizado

<sup>3</sup>Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento

<sup>4</sup>Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Ministério do Meio Ambiente

<sup>5</sup>Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ANVISA – Ministério da Saúde

<sup>6</sup>PM = pó molhável (tipo de formulação)

<sup>7</sup>Uso em campanhas de saúde pública e por instituições especializadas

veis pela formação de proteínas Cry ativas contra coleópteros e lepidópteros. Outra estratégia envolvendo os genes *cry* é a possibilidade de expressão em organismos recombinantes heterólogos. Essa tecnologia permitiu que a capacidade de produção da toxina Cry fosse transferida para outros organismos, agregando vantagens aos produtos, como o controle de pragas inacessíveis aos produtos convencionais e

maior estabilidade das proteínas Cry no ambiente. Com essa finalidade, foram utilizados organismos colonizadores de plantas, como *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum*, *Bacillus pumilus* e *Rhizobium leguminosarum*, além de fungos ectomicorrízicos, como *Laccaria bicolor*. Da mesma forma, a introdução de genes *cry* em bactérias endofíticas que colonizam o sistema

vascular das plantas permitiu o controle dos insetos que vivem no interior do caule e das raízes (Arantes et al., 2002).

Além das linhagens de *B. thuringiensis* melhoradas geneticamente e da construção de microrganismos recombinantes heterólogos, outro produto biotecnológico surgiu no final do século XX, gerado pela inserção de genes *cry* em plantas, formando as chamadas plantas Bt, as

quais produzem suas próprias proteínas Cry, ficando protegidas do ataque de insetos susceptíveis. A produção destas plantas ocorre em laboratório com o emprego de métodos de engenharia genética (Capalbo et al. 2004).

### Métodos moleculares para se obter plantas Bt

O desenvolvimento das plantas transgênicas só foi possível devido a universalidade da molécula de DNA, presente nas células de todos os organismos vivos. Essa molécula estoca a informação genética e orquestra os processos metabólicos da vida. Mesmo espécies completamente diferentes têm mecanismos equivalentes para converter a informação genética contida no DNA em proteínas, o que significa que um segmento de DNA proveniente de uma bactéria pode ser bem interpretado e traduzido em uma proteína funcional quando inserido numa planta.

O fragmento de DNA a ser inserido no genoma da célula vegetal normalmente acrescenta um fenótipo ou causa alterações no fenótipo original, como a produção de nova(s) proteína(s). O primeiro passo para que isso seja feito, é a preparação do DNA exógeno, que deve conter, no mínimo, um promotor (para ativar o gene), o gene de interesse (um gene *cry* no caso das plantas Bt), uma seqüência de término (uma seqüência de DNA que sinaliza o final da transcrição do gene) e um gene codificante para uma marca que permita a seleção das células que foram transformadas.

Para a obtenção de plantas transgênicas, o DNA exógeno deve ser inserido no genoma da célula vegetal, permanecendo estável. Se a inserção do DNA é direcionada a um loco pré-determinado, o processo é chamado de recombinação homóloga. Ao contrário, se a inserção do DNA ocorrer ao acaso, o processo é denominado recombinação heteróloga. Uma vez estabelecido o DNA no genoma da

célula (cromossomo ou cloroplasto), seqüências exógenas são quimicamente indistinguíveis daquelas da célula vegetal, ou seja, a origem da seqüência de DNA não interfere nos processos de replicação e segregação. Para a obtenção das plantas Bt, segundo Prescott et al. (1999), quatro técnicas de transformação têm sido correntemente utilizadas: sistema *Agrobacterium*, eletroporação, biobalística e microinjeção.

O rendimento de qualquer um desses métodos de transformação é extremamente baixo, e para obter alto nível de transformantes, a seleção, em geral, é feita por meio de cultura de tecidos indiferenciados (calos) sobre um meio seletivo normalmente contendo antibiótico ou herbicida. Posteriormente, as células são estimuladas a iniciar um processo de diferenciação, para em seguida formar uma planta regenerada e fértil.

### Estratégias de seleção de plantas transformadas

Uma das etapas essenciais ao sucesso na obtenção de uma planta transgênica é a seleção de clones estáveis para a formação de plantas adultas nas quais podem ser quantificados os níveis de expressão da molécula de interesse. Entre as estratégias correntemente utilizadas para recuperar transformantes, estão: o emprego de genes de resistência a um agente químico seletivo, como um antibiótico ou um herbicida; o uso de genes que conferem um fenótipo que permite seleção visual ou física (como o desenvolvimento da coloração); ou a identificação de plantas transformadas por meio de amplificação do gene inserido por PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) ou por *Southern blot*.

A utilização de agentes seletivos é extremamente vantajosa em relação a outros métodos, por isso é o método mais empregado na seleção de OGMs. Em meio seletivo, esses agentes impedem o desenvolvimento de células não-transforma-

das, ou seja, que não são portadoras dos transgenes, não havendo necessidade de posterior separação entre células transformadas e não-transformadas. Entre os genes de resistência a antibióticos mais utilizados, destacam-se o gene *bla*<sub>TEMP</sub>, que codifica resistência aos aminoglicosídeos, como a ampicilina e a penicilina, o gene *aadA*, que confere resistência à estreptomicina e à espectinomicina, e um gene *aph*, mais especificamente o *aph(3')*, também designado *nptII*, que codifica para a resistência à kanamicina e à neomicina.

A preocupação com os possíveis efeitos ambientais indesejáveis dos genes de resistência aos antibióticos foi um dos principais fatores que incentivaram o desenvolvimento de novas tecnologias de clonagem. Entre elas, a técnica em que as células vegetais são transformadas com construções específicas em que o gene de resistência ao antibiótico se encontra flanqueado por seqüências de DNA denominadas *lox*. Posteriormente, as plantas obtidas são cruzadas com outras plantas transgênicas contendo o gene *cre*, que codifica para a recombinase Cre. Dentre as plantas resultantes, obtêm-se aquelas em que o gene de resistência ao antibiótico foi retirado mediante a recombinação das seqüências *lox*, mantendo-se, no entanto, o gene de interesse. Um exemplo desse processo é encontrado no trabalho de Ow (2002).

Entre os métodos que permitem a seleção visual dos transformantes, destaca-se a utilização de genes que codificam para a formação de pigmentos, sendo visualizada coloração específica nos transformantes. A enzima beta-glucuronidase é a base do sistema GUS, cuja expressão é verificada em meio de cultura em condições propícias ao desenvolvimento da coloração azul pelas células transformadas. Essas células são então separadas daquelas sem a coloração e transferidas para um novo meio de cultura, para a regeneração de uma planta adulta. Um exemplo do em-

prego desse sistema pode ser encontrado no trabalho de Arencibia et al. (1997).

Quando o número de células transformadas é baixo, pode-se também verificar a ocorrência de transformação por meio de reações de PCR, utilizando-se um iniciador cuja seqüência seja complementar ao gene trabalhado (no caso de planta Bt, o próprio gene *cry*). Também, pode-se utilizar o método *Southern blot*, detectando-se a presença de seqüências de DNA por meio da hibridação com um fragmento de DNA, marcado radioativamente ou por meio de métodos colorimétricos.

Após a confirmação da estabilidade do gene, mediante a verificação do fenótipo, deve-se então verificar e, ou, quantificar sua expressão. Entre os métodos utilizados, destaca-se *Northern blot* (detecção do RNAm), *Western blot* (detecção da proteína codificada pelo gene) e ensaios imunológicos. Posteriormente, é feita a constatação e a quantificação da atividade inseticida da planta transgênica, por meio de bioensaios com os insetos-alvo.

### Alterações moleculares dos genes *cry*

Antes de serem introduzidos numa planta, os genes *cry* devem ser alterados em sua seqüência de DNA por mutagênese sítio-dirigida. Isso é necessário para que as diferenças nos mecanismos de expressão entre organismos procariontes e eucariontes não bloqueie ou diminuam a expressão do gene. Alguns exemplos de alterações, realizadas na obtenção de algumas plantas Bt, são apresentados a seguir.

Os primeiros experimentos, para a obtenção de plantas expressando genes *cry*, foram realizados usando o gene *cry1A* inteiro. No entanto, somente baixos níveis de proteínas Cry foram obtidos e a planta não apresentou qualquer atividade inseticida. Os primeiros sucessos foram obtidos pela expressão de fragmentos de genes *cry* que codifi-

cam para a parte tóxica de proteínas Cry. Dessa forma, a expressão de fragmentos truncados dos genes *cry1Aa* e *cry1Ab* em plantas de tabaco resultaram em níveis significantes de produção de proteínas Cry e eficiente controle de lagartas de *Manduca sexta*.

No entanto, níveis de expressão de genes *cry* nativos truncados em plantas levam à produção de cerca de 0,001% do total de proteínas solúveis, sendo esses níveis menores que aqueles obtidos com outros transgenes. Isso se deve ao fato do genoma da planta apresentar alto conteúdo de Guanina (G) e Citosina (C), enquanto os genes *cry* têm alto conteúdo de Adenina (A) e Timina (T), o que pode levar a planta a processamentos incorretos e à formação de RNAm não-funcionais. Além disso, os códons usualmente presentes em genes *cry* são raramente utilizados em plantas, o que pode provocar pausas no ribossomo e talvez acelerar a degradação do RNAm do gene *cry* contido nas plantas.

Muitas plantas Bt foram construídas com os genes *cry1Ab* e *cry1Ac* truncados, mas outros genes também têm sido utilizados, como o *cry9C* em milho, resultando em proteção contra *Ostrinia nubilalis*, e a inserção do gene *cry3A* em batatas, que levou à expressão da produção de altos níveis da proteína Cry3A e ao controle de *Leptinotarsa decemlineata*. Além desses genes, foi construída uma versão do gene *cry1C* para a obtenção de altos níveis de expressão em plantas, proporcionando a proteção de tabaco e alfafa contra as lagartas *Spodoptera littoralis* e *S. exigua* e de brócolis contra *Plutella xylostella*.

Com o passar dos anos e o desenvolvimento de novos métodos moleculares, outras gerações de plantas Bt surgem, cada vez mais seguras e voltadas não só ao controle do(s) inseto(s)-alvo, mas também à conservação das condições ecológicas estabelecidas nas áreas de cultivo. Com esse intuito, pesquisadores vêm desenvolvendo plantas em que as

proteínas Cry podem ser expressas somente onde e quando necessárias através do uso de promotores tecido específico, tempo específico ou genes promotores induzíveis. Esses e outros cuidados são tomados no sentido de minimizar o desenvolvimento de resistência dos insetos às proteínas Cry e o fluxo gênico para variedades selvagens. Além disso, deve-se lembrar que várias outras estratégias também têm sido propostas para serem utilizadas no campo e que ajudam a retardar a ocorrência destes eventos.

### Análise de risco e adoção das plantas Bt

Os debates sobre a introdução comercial de plantas geneticamente modificadas em algumas regiões do mundo levaram a questionamentos sobre seu impacto potencial no ambiente. Dúvidas surgiram quanto à possibilidade de afetar organismos não alvo, cruzar e produzir plantas daninhas, ter efeito adverso sobre a biodiversidade e reduzir efetivamente o uso de insumos químicos indesejáveis. Embora se saiba do impacto inevitável da agricultura sobre o ambiente, foi questionado o quanto estas plantas afetariam o balanço entre a produção agrícola e a vida silvestre.

A controvérsia atingiu a opinião pública, demandou, e continua demandando, estudos extensos. Tais preocupações da sociedade transformaram as plantas Bt nas mais bem estudadas quanto aos riscos/benefícios envolvidos. A comunidade científica constatou evidências de que os benefícios são elevados para os produtores, porém reconhece que o processo regulatório precisa ser mais bem ajustado. Há um bem documentado histórico de segurança da aplicação de Bt, como produto formulado, no ambiente, devendo agora ser verificada se esta segurança é mantida na diversidade de veículos (como outras bactérias e plantas) desta bactéria bioinseticida.

As discussões que circundam o

processo regulatório das plantas transgênicas, e das plantas Bt especificamente, devem levar em conta a característica peculiar destas plantas de disseminar um princípio inseticida, tendo por veículo a própria planta. A maioria dos pesticidas sintéticos e também os naturais são aplicados por pulverização em tempo e quantidade determinados; a cobertura nunca atinge 100% e, em consequência, o princípio ativo não atinge todas as partes das plantas. O agricultor decide quando, onde e como será aplicado o pesticida tradicional, enquanto o princípio pesticida das plantas transgênicas (como nas plantas Bt) será liberado, na maioria dos casos, durante todo o ciclo de vida da planta e, com frequência, em todas as partes da planta.

Como forma de garantia de segurança para o ambiente e os consumidores, compete aos órgãos públicos de cada país controlar o uso de produtos utilizados no ambiente (alimentos, agricultura, pecuária, saúde pública, entre outros), requerendo sua avaliação adequada previamente ao seu registro para uso comercial. Compete ainda aos mesmos órgãos públicos estabelecer os critérios para a avaliação destes produtos, dentro de normas específicas que considerem as diferenças fundamentais entre produtos químicos e biológicos, transgênicos e não transgênicos, no que se refere a composição, forma de ação e comportamento no ambiente.

Os riscos ambientais analisados para as plantas transgênicas com característica pesticida (caso das plantas Bt) enquadram-se em quatro categorias amplas: - fluxo gênico do transgene para outras espécies ou variedades; - evolução de resistência nas pragas-alvo; - efeitos adversos nas espécies não alvo expostas à proteína Bt; - efeitos da proteína Bt na biota do solo; das quais discutiremos brevemente as duas últimas.

### **Efeito nas espécies não alvo**

Quando estão no campo, as culturas abrigam não somente os insetos-praga, mas também outros artrópodes (parasitóides e predadores), os quais desempenham importante papel na regulação das populações de herbívoros. Em termos ecológicos, essa hierarquia é chamada de interação trófica. As interações tróficas e os mecanismos para a interferência das plantas Bt sobre essas interações são complexos e dependem de muitos fatores, como: nível de resistência da planta, especificidade do novo caráter introduzido/expresso, em quais tecidos este caráter será expresso e por quanto tempo, presença de plantas suscetíveis próximas e manejo da cultura, ou seja, aplicação de inseticidas, controle de plantas invasoras, entre outros. A preocupação que levou a estes estudos foi a de que os insetos-alvo pudessem adquirir a proteína Cry produzida na planta Bt quando se alimentassem dela e, assim, expor a proteína aos inimigos naturais, seja por meio de seus fluidos corpóreos, seja mediante contaminação de suas larvas e disseminação em suas fezes. Há ainda a possibilidade de que, com a redução das aplicações de inseticidas em culturas Bt, as pragas secundárias tornem-se importantes, atingindo o papel de praga primária em relação àquela cultura.

Deve-se ressaltar que, em uma análise de risco, apesar da necessidade de se saber quantos e quais organismos podem consumir os tecidos das plantas, esse consumo e a dispersão deles na cadeia trófica só se constitui em risco se, em nível normal de consumo em campo, resultar em efeitos adversos.

Em 2001, a Agência de Proteção Ambiental americana (EPA) concluiu, em reavaliação do risco apresentado por plantas Bt, que as proteínas Cry de Bt produzidas nas plantas transgênicas não apresentam efeitos adversos às populações de organismos não alvo expostas às quantidades desta proteína que são encontradas nos tecidos dessas plantas ([www.epa.gov/pesticides/biopesti-](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt_brad.htm)

[cides/pips/bt\\_brad.htm](http://www.epa.gov/pesticides/pips/bt_brad.htm)).

### **Efeitos da proteína Bt na biota do solo**

Para que o ecossistema solo permaneça saudável, é necessário manter sua biodiversidade e a estabilidade desta diversidade. Assim, um dano potencial associado a plantas Bt é a possibilidade de alterações nos grupos funcionais presentes no solo, favorecendo determinado grupo em detrimento de outro. Proteínas Bt podem apresentar novo efeito tóxico para a biota, ou ser uma nova fonte de substrato. Mudanças na diversidade dos microrganismos do solo podem alterar irreversivelmente a dinâmica funcional do sistema solo-planta original.

O assunto é tão extenso quanto a diversidade de micro e macrorganismos presentes no solo. Para efeito de ilustração, podem-se apresentar os seguintes efeitos, potenciais, de plantas Bt na biota do solo:

- Organismos fragmentadores e, ou, decompositores – Plantas Bt exsudam, em maior ou menor quantidade, toxinas através das raízes, que poderiam afetar organismos responsáveis pela ciclagem de matéria orgânica, reduzindo ou impedindo a degradação de compostos como celulose, hemicelulose, quitina, lignina, com consequências para a fertilidade de plantas;

- Organismos envolvidos na fixação de N<sub>2</sub> atmosférico – se toxinas Bt afetarem bactérias envolvidas na fixação biológica do nitrogênio, como as bactérias diazotróficas (*Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*), ou as simbióticas (*Rhizobium* e *Bradbrizobium*), haverá dano às plantas que se beneficiam desta fixação biológica de N<sub>2</sub>;

- Organismos produtores de metabólitos secundários – Fungos, bactérias e actinomicetos, produtores de metabólitos secundários (enzimas, antibióticos), podem ser afetados pela

presença de plantas Bt, uma vez que as toxinas Bt podem inibir o desenvolvimento desses organismos no solo, e com isso interromper o ciclo de atividades benéficas desses organismos, como controle biológico natural.

Há muitos artigos científicos que evidenciam a inocuidade e a ausência de efeitos na biota do solo, pois quando presente no solo, parte das moléculas de proteínas Cry é degradada e parte delas é adsorvida às partículas do solo (não apresentando efeito algum sobre minhocas, nematóides, protozoários, bactérias e fungos presentes nele) sendo sugerida a leitura do trabalho de Rumjanek e Fonseca (2003) sobre o tema.

### Comentários finais

Todos os sistemas de produção agrícola causam, inevitavelmente, algum impacto ambiental. O uso de plantas e microrganismos, transgênicos ou convencionais constitui mais um fator de impacto, entre os muitos já estabelecidos. A genômica e as ferramentas biotecnológicas podem apresentar benefícios ambientais, devendo ser avaliadas no contexto de cada ecossistema e prática de manejo.

Pode-se, com segurança, concluir que alguns fatores básicos devem, obrigatoriamente, ser considerados numa avaliação de risco potencial ao meio ambiente. Entre esses fatores, podem ser incluídos: comportamento já conhecido ou previsível do organismo transgênico; possibilidade de multiplicação e disseminação em ecossistemas descritos; e impacto conhecido ou previsível sobre plantas, animais e microrganismos-não-alvo. O controle de pragas é essencial para manter a produtividade em níveis elevados, para que não seja necessária a expansão da área agricultável, favorecendo, dessa forma, a preservação ambiental, sem prejuízo da instalação da crescente população.

A avaliação e o estabelecimento de métodos para o estudo de impac-

to de biopesticidas foram apresentados no final dos anos 90. Esses métodos devem ser estabelecidos para as plantas transgênicas, uma vez que as ações voltadas para a segurança ambiental devem promover a preservação da biodiversidade, a manutenção dos ecossistemas e os respectivos padrões de sustentabilidade requeridos. Respostas a questões como sobrevivência, disseminação, colonização e função da liberação desses organismos em seus *habitats* precisam ser obtidas, bem como devem ser considerados os aspectos socioeconômicos e os problemas advindos da ausência de barreiras políticas ou fronteiras que restrinjam a disseminação do organismo. Reconhece-se que a liberação de transgênicos no ambiente sem avaliação apropriada de seu impacto ambiental pode levar a prejuízos importantes, especialmente em função dos custos elevados da tecnologia. Além disso, a biodiversidade está relacionada aos valores e às tradições culturais das comunidades, que não podem ser relegadas a nível inferior de consideração.

Ressalta-se, ainda, que futuras pesquisas com transgêneses devem incluir plantas com maior resistência a doenças e estresses (bióticos e abióticos), com maior conteúdo nutricional, bem como espécies de plantas e animais com capacidade de produzir proteínas de importância farmacêutica, como vacinas. Para tanto são necessárias atuação proativa dos órgãos públicos de pesquisa e uma política pública que preconize sua melhor atuação neste cenário de mudanças econômicas e tecnológicas.

### Referências Bibliográficas

Arantes, O.M.N., Vilas-Bôas, L.A., Vilas-Bôas, G.T. 2002. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no controle biológico. In: Serafini, L.A., Barros, N.M., Avedo, J.L. (Eds.). Biotecnologia: Avanços na agricultura e agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS. v. 2, p. 269-293.

Arencibia, A., Vázquez, R. I., Prieto, D., Téllez, P., Carmona, E. R., Coego, A., Hernández, L., De la Riva, G. 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Molecular Breeding* 3: 247-255.

Capalbo, D.M.F.; Vilas-Bôas, G.T. Arantes, O. M. N. 2004. *B. thuringiensis*: Formulações e Plantas Transgênicas Biotecnologia e Meio Ambiente, Viçosa, 2004, Cap.11, pp 309 a 350.

Frankenhuyzen, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (ed.). In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester: John Wiley and Sons. p. 1-36.

Ow, D.W. 2002. Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Molecular Biology* 48: 183-200.

Rumjanek, N.G., Fonseca, M.C.C. 2003. Possíveis efeitos do cultivo do algodoeiro Bt sobre a comunidade de microrganismos do solo. In: Pires, C.S.S. Fontes, E.M.G. e Sujii, E. R. (eds.). Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas – o algodão resistente a insetos como estudo de caso. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. p. 117-134.

Suzuki, M.T., Lereclus, D., Arantes, O.M.N. 2004. Fate of *Bacillus thuringiensis* in different insect larvae. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 973-975.

Vilas-Bôas, G. F. L. T., Vilas-Bôas, L. A., Lereclus, D. e Arantes, O. M. N. 1998. *Bacillus thuringiensis* conjugation under environmental conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 25: 369-374.